

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE
SANTANA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
BIOTECNOLOGIA



MANOELITO COELHO DOS SANTOS JUNIOR

PURIFICAÇÃO PARCIAL, CARACTERIZAÇÃO E ESTUDOS DE
ANCORAGEM MOLECULAR DA PIROFOSFORILASE DO
MONILIOPHTHORA PERNICIOSA

Feira de Santana, BA
2012

MANOELITO COELHO DOS SANTOS JUNIOR

PURIFICAÇÃO PARCIAL, CARACTERIZAÇÃO E ESTUDOS DE
ANCORAGEM MOLECULAR DA PIROFOSFORILASE DO
MONILIOPHTHORA PERNICIOSA

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia,
da Universidade Estadual de Feira de Santana como requisito parcial
para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Alex Gutterres Taranto
Co-orientador: Prof Drª Sandra Aparecida de Assis

Feira de Santana, BA
2012

Ao meu Amor.

AGRADECIMENTOS

Mais um etapa de minha vida foi vencida, foram quatro anos de luta e muito aprendizado, mas nesse período em nunca estive só e, se meu trabalho chegou ao fim, isso foi graças a todos vocês que de certa forma me ajudaram a construir esse sonho. Agradeço a todos do fundo do coração. Inicialmente, agradeço a Deus pela força e sabedoria que me concedeu para que eu conseguisse superar todas as adversidades que surgiram nesses quatro anos, e não foram poucas.

Agradeço a minha Noiva Amália Ivine, minha fonte de inspiração e motivação, que sempre esteve ao meu lado em todas as horas, sua presença, conselhos e paciência foram importantes em todas as etapas de minha vida. O amor não consiste em olhar um para o outro, mas sim em olhar juntos para a mesma direção.

A minha mãe, Aldezira Mascarenhas, por todo o amor e dedicação durante todas as etapas de meu desenvolvimento, sem ela eu não conseguiria chegar onde estou. Ao meu pai, Manoelito Coelho, devido ao incentivo dado nas horas mais difíceis. A meu irmão, Ailton Mascarenhas, pelo companheirismo, amizade e incentivo.

Os amigos Franco, André, Hugo e Pedro, a amizade de vocês foi fundamental para a construção deste trabalho. Todos os conselhos e sugestões dados ao longo desses anos foram aproveitados de alguma forma.

Ao prof. Ângelo pelos ensinamentos na área da computação e pela paciência para submeter todos os meus cálculos, sem sua ajuda estaríamos ainda no meio do trabalho.

A prof. Sandra que foi bem mais que uma co-orientadora, mas uma amiga em si, seus conselhos foram fundamentais para o meu desenvolvimento.

A meu orientador prof. Alex Gutterres pela dedicação e atenção dada durante a construção deste 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), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e a Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP) pelos incentivos financeiros para o desenvolvimento deste trabalho.

A todos os outros que me ajudaram direta ou indiretamente, meu sincero agradecimento.

Conhecimento real é saber a extensão da própria ignorância (Confúcio).

RESUMO

A enzima UDP-N-acetilglicosamina pirofosforilase de *Moniliophthora perniciosa*, fungo patogênico causador da doença vassoura-de-bruxa do *Theobroma cacao*, foi o foco central deste trabalho. A enzima foi purificada, caracterizada, e por fim, utilizando um modelo 3D da pirofosforilase foram realizados estudos de ancoragem molecular. A vassoura-de-bruxa causou grandes impactos na economia baiana. Consequentemente, medidas para o seu controle foram empregadas, porém sem muito sucesso. Assim, linhas de pesquisa envolvendo alvos mais específicos estão sendo desenvolvidas para a seleção de antifúngicos mais seletivos e economicamente viáveis. A enzima pirofosforilase apresenta características estruturais e funcionais diferentes em organismos eucariontes e procariontes, portanto, o desenvolvimento de inibidores para a mesma, deve ser baseado no organismo que se está estudando. A enzima do fungo *M. perniciosa* foi parcialmente purificada por precipitação com sulfato de amônio e cromatografia de gel filtração em Sephacryl S-200. A metodologia de superfície de resposta (MSR) foi usada para a obtenção do pH e temperatura ótima. Como resultado, quatro diferentes isoenzimas (PyroMp I, PyroMp II, PyroMp III e PyroMp IV) apresentaram pH ótimo na faixa de 6,9-8,4 e temperatura ótima variando entre 28 a 68°C. Com base nas características do substratos, foram selecionados dez inibidores, os quais foram refinados pelo método AM1. Estudos de ancoragem molecular entre estes compostos e a enzima foram realizados pelo programa Autodock Vina, seguido de refinamento por simulações de dinâmica molecular. Os resultados da ancoragem indicam que o reconhecimento molecular da enzima com o substrato foi principalmente por ligações hidrogênio entre os ligantes e os aminoácidos Arg116, Arg383, Gli381 e Lis408; e algumas poucas interações hidrofóbicas com os resíduos de Tir382 e Lis123. Dos compostos analisados, NAG5 apresentou melhor energia de ligação (-95,2kcal/mol). As próximas etapas para o controle da vassoura-de-bruxa envolvem a obtenção dos compostos estudados e os respectivos testes *in vitro* e *in loco*.

Palavras-chave: pirofosforilase, vassoura-de-bruxa, purificação, ancoragem molecular.

ABSTRACT

The enzyme UDP-N-acetylglucosamine pyrophosphorylase *Moniliophthora perniciosa*, pathogenic fungus that causes witches' broom disease in *Theobroma cacao*, was the central focus of this work. The enzyme was purified and characterized, finally, using a 3D model of pyrophosphorylase's docking study was performed. The witches' broom caused deep impact in the Bahia economy. Consequently, measures for its control were used, but without success. Thus, several researches involving more specific targets are being developed for the selection of more selective and economically viable antifungal agents. The enzyme has pyrophosphorylase structural and functional characteristics in different eukaryotic and prokaryotic organisms, so the development of inhibitors to it, should be based on organism which is being studied. The enzyme of the fungus *M. perniciosa* was partially purified by ammonium sulfate precipitation and gel filtration chromatography on Sephacryl S-200. The response surface methodology (RSM) was used to obtain the optimal pH and temperature. As a result, four different isoenzymes (PyroMp I, PyroMpII, PyroMpIII and PyroMpIV) showed that the optimum pH range of 6.9 to 8.4, and temperature ranging between 28-68 ° C. Based on the characteristics of substrates and products ten inhibitors were selected, which were refined by AM1. Docking studies between these compounds and enzyme were performed by AutoDock Vina software, following of refinement by molecular dynamics simulations. The results of docking suggest that the molecular recognition of the enzyme with the substrate occur mainly by hydrogen bonds between ligands and Arg116, Arg383, Gli381, and Lis408 aminoacids; and few hydrophobic interactions with Tir382 and Lys 123 residues. Among the compound analyzed, the NAG5 showed the best binding energy (-95.2 kcal/mol). The next steps for the control of witches' broom involve the attainment of the compound studied and the respective *in vitro* and *in loco* tests.

Keywords: pyrophosphorylase, witches' broom, purification, docking.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

Figura 1: Comparação entre partes do cacau antes e após a infecção. Em I está mostrado uma plantação de cacau, em II folhas normais e III um fruto em perfeitas condições para consumo. IV mostra o tronco da árvore após a infecção, assim como nas folhas e frutos, V e VI respectivamente. 20

Figura 2: Segmento de quitina com unidades de N-acetil-D-glicosamina em ligações $\beta(1-4)$. 26

Figura 3: Metabolismo de quitina 27

CAPÍTULO 2

Figura 1: Rotas de biossíntese da UDP-N-acetilglicosamina em procariotos e eucariotos 38

Figura 2: Reação de formação da UDP-N-acetilglicosamina via mecanismo de substituição nucleofílica bimolecular (S_N2) sugerido por alguns autores. 39

Figura 3: Sítio ativo da UNAcP de *Escherichia coli* esquematizando o equilíbrio de cargas ocasionado pela presença do íon Co^{2+} . 40

Figura 4: Estrutura da UNAcP da *Escherichia coli* evidenciando a localização do domínio-C e região N-terminal. 42

Figura 5: Estrutura da UNAcP da *Escherichia coli*. A esquerda vista paralela ao eixo molecular do domínio-C e a direita o L β H visto perpendicular ao eixo molecular 3D. 43

Figura 6: Modelo 3D da UNAcP do fungo *Moniliophthora perniciosa*. 44

Figura 7: Interações hidrofílicas (A) e hidrofóbicas (B) entre a acetilglicosamina e o sítio ativo da enzima pirofosforilase 45

CAPÍTULO 4

Figura 1: Estrutura da Uridina (A); Acetilglicosamina-1-fosfato (B); UTP (C). 68

Figura 2: Estrutura dos 10 inibidores protótipos e seus respectivos nomes. 69

Figura 3: Estruturas otimizadas pelo método AM1 com os correspondentes orbitais de fronteira HOMO e LUMO. 70

Figura 4: Redock das estruturas utilizadas como referência, juntamente com o valor 72

de energia de afinidade e o RMS. Em rosa as estruturas de referencia, em azul o UTP e em verde a N-acetilglicosamina-1-fosfato. Imagem construída no programa AutoDockTools 1.5.6rcz2. RMS calculado pelo programa MacPymol.

- Figura 5:** Valores de energia de afinidade para cada caixa de ancoragem 73
- Figura 6:** Gráfico de RMSD após a simulação de dinâmica molecular para cada complexo. 74
- Figura 7:** Gráficos de energia após as simulações de dinâmica molecular para cada complexo. 75
- Figura 8:** Interações formadas entre os compostos NAG5 e NAG2 com a enzima pirofosforilase. Linha verde: HBA, Linha Azul: HBD, Linha Rosa: Interações hidrofóbicas. Vizualização gerada pelo programa Discovery Studio 3.1. 77
- Figura 9:** Estrutura dos compostos UEFS24 (A) e UEFS35(B) 79

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 2

Tabela 1: Estruturas 3D, resolução, R-factor, R-free e origem da UNAcP depositadas no PDB. 47

Tabela 2: Efeitos de cátions divalentes na atividade da enzima UDP-GlcNAc pirofosforilase de *Neurospora crassa* 51

CAPÍTULO 4

Tabela 1: Energia dos orbitais HOMO e LUMO dos inibidores propostos (kcal/mol). 71

Tabela 2: Resultados encontrados para energia de ligação. 76

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	13
CAPÍTULO 1	
1.1 INTRODUÇÃO	18
1.2 FISIOPATOLOGIA	20
1.3 ASPECTOS GERAIS DO FUNGO <i>M. PERNICIOSA</i>	21
1.4 MÉTODOS PARA CONTROLE DA VASSOURA-DE-BRUXA	23
1.4.1 Alvos moleculares no <i>M. perniciosa</i> para o desenvolvimento de novos fármacos.	25
1.5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	29
CAPÍTULO 2	
2.1 INTRODUÇÃO	36
2.2 REAÇÃO CATALISADA	37
2.3 CARACTERIZAÇÃO PROTÉICA	41
2.4 EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DA UDP-N-ACETILGLICOSAMINA PIROFOSFORILASE	48
2.5 CINÉTICA ENZIMÁTICA	51
2.6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	52
CAPÍTULO 3	
3.1 INTRODUÇÃO	58
CAPÍTULO 4	
4.1 INTRODUÇÃO	61
4.2 MATERIAIS E MÉTODOS	64
4.2.1 Seleção dos ligantes	64
4.2.2 Estudos de Ancoragem	65
4.2.3 Triagem virtual	67
4.3 RESULTADOS E DISCUSSÕES	68
4.4 CONCLUSÕES	80
CONCLUSÃO GERAL	85
APÊNDICE A: Purification, characterization and structural determination of UDP-N-acetylglucosamine pyrophosphorylase produced by <i>Moniliophthora perniciosa</i>	86

INTRODUÇÃO GERAL

Em 1989 a cultura do cacau brasileira sofreu uma queda em sua produção, o que, em parte, pode ser explicado pelo surgimento e desenvolvimento do fungo *Moniliophthora perniciosa* (Stahel) Singer, que é responsável por uma doença conhecida como vassoura-de-bruxa do cacau (PEREIRA et al., 1990). Esta é uma praga responsável por danos que compreendem efeitos econômicos e sociais, além do impacto agrônomico imediato, tais modificações levaram o Brasil a alterar sua situação de exportador para importador do cacau. Em 2000, foram importadas cerca de 71.000 toneladas de amêndoas de cacau (COMPANHIA DAS DOCAS DO ESTADO DA BAHIA, 2002).

A Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira (CEPLAC), fundada em 1957, está tem como uma de suas missões a recuperação da economia regional, enfatizando no combate à vassoura-de-bruxa, uma vez que a mesma está dizimando os cacauais, deixando mais de duzentos mil desempregados e causando danos irreparáveis à natureza. (CEPLAC, 2011)

O controle químico da vassoura-de-bruxa foi inicialmente testado em 1909 no Suriname, desde de então, novas tentativas foram feitas, inclusive no Brasil, sem que os resultados tivessem sido inteiramente satisfatórios e/ou econômicos. Rudgard e Lass (1995) apud Oliveira e Luz (2005) salientaram que, em função da inadequação de outras medidas de controle, o controle químico ainda ofereceria, em curto prazo, as melhores opções de contenção da praga. (SOBERANIS et al., 2000; OLIVEIRA, LUZ, 2005).

Atualmente a necessidade de controle da praga se baseia no fato de se encontrar novos fungicidas que tenham seletividade e bom custo de aplicação, o desenvolvimento de novos antifúngicos depende das diferenças bioquímicas entre os fungos e outros organismos. Da mesma forma como os inibidores da biosíntese da parede celular bacteriana como as penicilinas e cefalosporinas, têm apresentado bons resultados no controle de infecções bacterianas, a parede celular dos fungos é um bom alvo para o desenvolvimento de potentes antifúngicos (GRIFFITH, TRACY, 2002). A UDP-N-acetilglicosamina é um precursor essencial para a síntese de quitina, principal componente da parede celular fúngica (HERSCOVICS; ORLEAN, 1993). Na busca por um controle efetivo da vassoura-de-bruxa, escolheu-se a rota metabólica que leva a síntese da quitina.

O alvo escolhido nessa via metabólica foi a enzima pirofosforilase que é a responsável em realizar a reação que forma UDP-N-acetilglicosamina. Desta forma, a inibição da formação de UDP-N-acetilglicosamina afetará a formação de quitina e assim a síntese 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 ocorre uma transferência de um grupamento fosfato do UTP para a N-acetilglicosamina com posterior liberação de fosfato inorgânico e UDP (STROMINGER; SMITH, 1959). O UDP-N-acetilglicosamina é um dos principais componentes de quitina, sugerindo que a enzima pirofosforilase pode ser um forte alvo molecular para o desenvolvimento de novos agentes antifúngicos, uma vez que a parede celular dos fungos é composta principalmente por quitina (MIO et al., 1998; POMPEO et al., 2001; YAMADA-OKABE et al., 2001).

As pirofosforilases mostram um domínio central na forma α/β . Este enovelamento característico é denominado de Rossmann fold, sendo constituído de oito folhas beta rodeadas por oito alfa hélices, e nas extremidades duas pequenas regiões de folha beta. O domínio carboxi terminal é formado por 68 resíduos de aminoácidos. Em contraste, a região amino terminal é formada por segmentos semi-conservados (PENEFF et al, 2001). No entanto, mesmo sendo descontínuo esta região mostra certo grau de identidade quando comparada com enzimas de bactérias e de outros organismos superiores. A sequência semi-conservada inclui Leu-X₂-Gly-X-Gly-Thr-X-Met-X₄-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, tais como Mg⁺², Co⁺² e Mn⁺² (OLSEN; RODERICK, 2001).

Este trabalho focou a extração, purificação, caracterização, ensaios inibitórios e estudos de ancoragem molecular seguidos por simulações de dinâmica molecular da enzima pirofosforilase do fungo *M. perniciosus*. O objetivo geral foi a obtenção da enzima e sua caracterização, juntamente com os estudos de ancoragem molecular. Os objetivos específicos foram: Isolar, purificar e caracterizar a enzima pirofosforilase do fungo *M. perniciosus*; realizar estudos de inibição na enzima pirofosforilase extraída do fungo; desenho de composto(s) protótipo(s); realizar ancoragem moleculares; estudar as interações intermoleculares entre os inibidores e a enzima alvo e sugerir novos compostos. Todos estes estudos contribuirão para o desenvolvimento racional e maior compreensão

do mecanismo de ação da enzima pirofosforilase do fungo *M. perniciosus*.

REFERÊNCIAS

CEPLAC. A CEPLAC. Disponível em: <http://www.ceplac.gov.br/paginas/ceplac/ceplac.asp>. Acesso em: 22 de ago. 2011.

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.

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.

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

MIO, T. et al. The eukaryotic UDP-N-Acetylglucosamine pyrophosphorylases. The Journal of Biological Chemistry. v. 273, n. 23, p. 14392-14397, 1998.

OLIVEIRA, M.L.; LUZ, E.D.M.N. Vassoura-de-bruxa. In: _____. Identificação e manejo das principais doenças do cacaueteiro no Brasil. Ilhéus, CEPLAC/CEPEC/SEFIT, 2005, p. 15-33.

OLSEN, L. R.; RODERICK, S. L. Structure of Echerichia coli GlnU pyrophosphorylase and acetyltransferase active sites. Biochemistry, 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 European Molecular Biology Organization Journal, 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. Tropical Agriculture, v. 67, n. 2, p. 188-189, 1990.

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

SOBERANIS, W. Increased frequency of phytosanitary pod removal in cocoa (Teobroma cacao L.) increases yield economically in eastern Peru. Crop Protection, v. 18, p. 667-685, 2001.

STROMINGER, J. L.; SMITH, M. S. Uridine diphosphoacetylglucosamine pyrophosphorylase. The Journal of Biological Chemistry. v. 234, n. 7, p. 1822-1827, 1959.

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* European Journal of Biochemistry, v. 268, p. 2498-2505, 2001.

CAPÍTULO 1

VASSOURA-DE-BRUXA

1.1 INTRODUÇÃO

A vassoura-de-bruxa foi observada inicialmente em 1700, mas a investigação científica sobre a devastação que esta doença causa em plantações iniciou-se em 1890 por Gregor Stahel, que isolou e nomeou o fungo causador - *Marasmius perniciosus*. A vassoura-de-bruxa já foi detectada na Guiana (1906), Colômbia (1917), Equador (1921), Trindade e Tobago (1939), Granada (1948), São Vicente (1988), Bolívia (1989), Brasil (Bahia e Região da bacia Amazônica) (1989) e no Panamá (1989) (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).

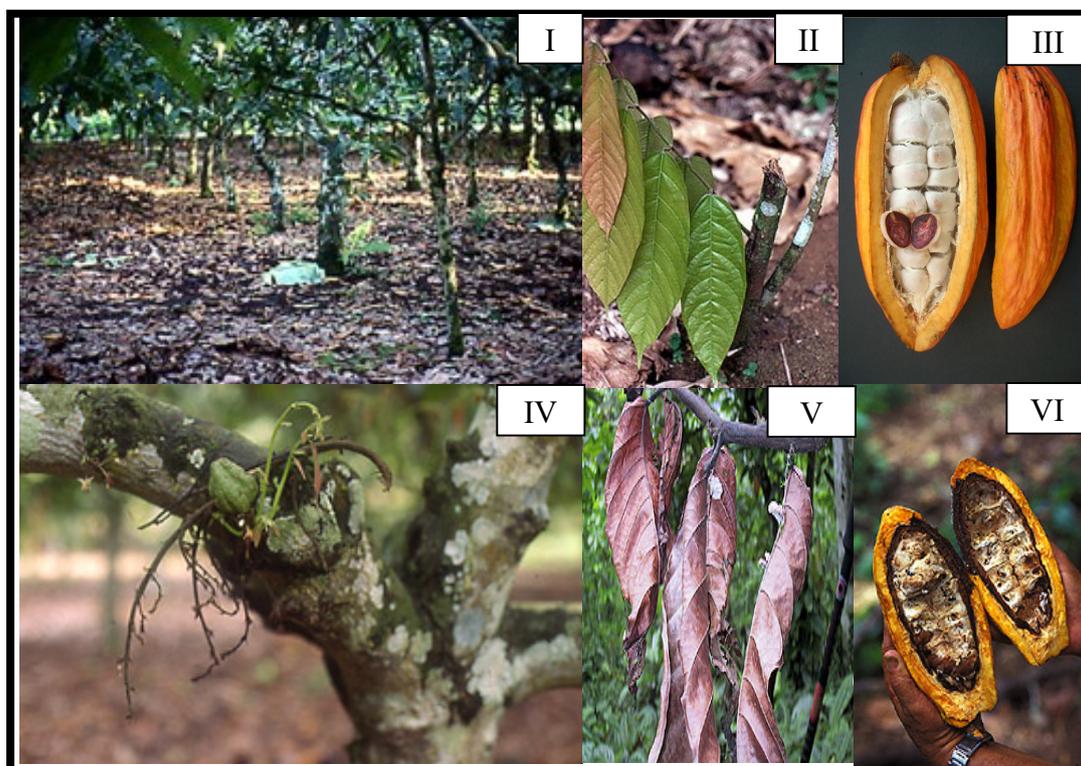
Na região costeira da Mata Atlântica da Bahia, a incidência da vassoura-de-bruxa foi observada pela primeira vez em 1989. A alta densidade de plantações de cacau aliada à falta de um período seco contribuiu para o estabelecimento e propagação do fungo. Na cidade de Ilhéus-BA, uma grande área de plantações de cacau foi infectada pela vassoura-de-bruxa. Segundo dados da Companhia das Docas do Estado da Bahia (2002), até 1989, data em que a vassoura-de-bruxa chegou à Bahia. Este estado correspondia à cerca de 84,5% da produção nacional e 15% da mundial de cacau. Com a ocorrência da doença na região cacauífera baiana, a produção caiu drasticamente transformando o Brasil de exportador a importador de cacau.

A vassoura-de-bruxa é uma das mais importantes doenças do cacau, ocorrendo principalmente nos países da América do Sul. No Brasil atinge as lavouras cacauíferas da Bahia e da Amazônia, causando perdas de até 90% da produção (PURDY; SCHMIDT, 1996). A vassoura-de-bruxa provoca um superbrotamento das partes terminais do cacauífera, possuindo sintoma característico à formação dos brotos hipertrofiados de excessivo desenvolvimento, aparentando vassoura - surgindo daí o nome da doença. De início, o desenvolvimento da doença é rápido, porém depois de 5 a 6 semanas começa a secar, podendo cair ou ficar aderente à árvore (PEREIRA, 1990).

1.2 FISIOPATOLOGIA

A infecção tem início quando os basidiósporos germinam e penetram no tecido meristemático e vagens da planta originam assim o estágio biotrófico da colonização. Com isso, ocorre uma hipertrofia ou hiperplasia das células hospedeiras. Esse intumescimento leva a parte atingida a ter uma aparência de uma vassoura-de-bruxa. Essas vassouras, quando jovens, têm uma coloração verde, mas morrem com 1 a 2 meses dando uma coloração marrom as árvores infectadas, devido a necrose ocasionada pela colonização (estágio saprofítico). A infecção mais grave ocorre nas flores jovens e nos frutos que estão no tronco (Figura 1). Como o fungo responsável pela infecção que leva a vassoura-de-bruxa acomete plantas em desenvolvimento, somente a utilização de fungicidas não apresenta efetividade ficando o controle biológico como alternativa estratégica para o combate a propagação da vassoura-de-bruxa (GRIFFITH et al., 2003; RUBINI et al, 2005; PEREIRA, 1990).

Figura 1: Comparação entre partes do cacaueiro antes e após a infecção. Em I está mostrado uma plantação de cacau, em II folhas normais e III um fruto em perfeitas condições para consumo. IV mostra o tronco da árvore após a infecção, assim como nas folhas e frutos, V e VI respectivamente.



Fonte: BOTANISCHER GARTEN, 2007; NEW CROP, 2007.

Estas desordens fisiológicas são frequentemente causadas pela liberação, dentro da célula, de grande quantidade de compostos fenólicos, etilênicos, açúcares solúveis e taninos, levando a morte celular ou alterações no balanço hormonal (ODJAKOVA; HADJÜVANOVA, 2001; SCARPARI et al., 2005). A expressão de enzimas que levam a formação de etileno está associada com a necrose que ocorre nas folhas. Inicialmente acontece a liberação de etileno com posterior necrose; estudos relatam que a emissão de etileno está associada com hipertrofia (ORCHARD et al, 1994), degradação da clorofila (TREBITS; GOLDSCHMIDT; RIOV, 1993), e epinastia da folha, achados estes que ocorrem durante a interação do *M. pernicioso*/cacao (GARCIA et al, 2007).

Na fase biotrófica o fungo necessita dos tecidos vivos do hospedeiro, direcionando o metabolismo catabólico da planta para as suas necessidades básicas, como nutrição, crescimento e desenvolvimento do micélio (SCARPARI et al., 2005; KILARU, HASENSTEIN, 2005). Carboidratos específicos possuem um papel importante na mudança da fase biotrófica para a fase saprofítica, pois o fungo ao impedir o movimento preferencial destes carboidratos das partes saudáveis da planta para as regiões infectadas, leva à necrose rápida dos tecidos, tanto por inanição como por resposta de defesa da planta, já que esta tende a alterar sua fisiologia liberando dentro da célula grande quantidade de compostos fenólicos, etileno, açúcares solúveis e taninos levando a célula à morte (ODJAKOVA, HADJÜVANOVA, 2001; SCARPARI et al., 2005; GALANTE, 2008).

Adicionalmente, estudos das vias de sinalização entre planta-patógeno mostraram que carboidratos possuem um papel importante na mudança da fase biotrófica para a fase saprofítica do fungo (SCARPARI et al., 2005). Observa-se também que espessamento da parede celular pode provocar o adensamento da cutícula, e esta servir como sinalizador para o fungo reconhecer o hospedeiro (SANTEN, 2007).

1.3 ASPECTOS GERAIS DO FUNGO *M. PERNICIOSA*

O fungo *M. pernicioso* pertence à divisão Eumycota, subdivisão Basidimycotatina, ordem agaricales e família Tricholomataceae (LANA, 2000). Este foi identificado inicialmente por Stahel, como *Marasmius perniciosus*, e posteriormente foi transferido por Singer para outro gênero, *Crinipellis*, o que foi endossado por outros pesquisadores (BRANDEAU, 1992). No entanto, a classificação sofreu uma reformulação, por meio de análises filogenéticas de quatro regiões de genes nucleares (28S rDNA, 18S rDNA, RPB1 e

EF1), Aime e Phillips-Mora (2005) determinaram que os fungos *C. pernicioso* e *Moniliophthora roreri* pertencem ao mesmo grupo taxonômico. Desta forma, o *C. pernicioso* passou a ser denominado de *Moniliophthora pernicioso* (COSTA et al, 2009).

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

A grande variabilidade de hospedeiros do *M. pernicioso* permite separá-lo em grupos de acordo com o gênero que infectam, denominados biótipos. Desta forma, há três biótipos caracterizados: o biótipo Cacau (biótipo-C), que tem como hospedeiro as espécies do gênero *Theobroma*, principalmente o *T. cacao*; o biótipo Solanacea (biótipo-S) que infectam as espécies da família Solanaceae, e o biótipo Liana (biótipo-L) que são encontrados em lianas e cipós das famílias Malpighiaceae e Bignoneaceae (PURDY, 2007). O biótipo Bixa é considerado o quarto biótipo e foi relatado por Bastos e Andebrahn (1986) apud Leal Júnior et al (2005), mas não foi notificada a produção de basidiocarpos nos ramos infectados. Um quinto biótipo, o biótipo-H, foi sugerido por Griffith et al. (2003) no qual se enquadra o *Heteropterys acutifolia* A. Juss.

O *M. pernicioso* é um patógeno hemibiotrófico nos quais os basidiósporos são as únicas estruturas do fungo em condições naturais capazes de infectar os tecidos meristemáticos do *Theobroma cacao* e várias outras espécies do gênero *Theobroma* e *Herrania* (todos os membros da família Sterculiaceae). Estes são produzidos em lamelas, na região inferior do píleo do basidiocarpo, onde os dois núcleos nas células da hifa dicariótica da camada do himênio migram para o interior da basídia enquanto ocorre fusão nuclear. 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).

O fungo possui duas fases fisiológicas e morfológicas distintas. Uma delas é parasítica, monocariótica, de crescimento intercelular, com ausência de grampos de conexão, encontrada em tecidos vivos, enquanto que a outra é saprofítica, dicariótica, com crescimento intracelular

e presença de grampos de conexão, encontrada somente em tecidos mortos (COSTA et al, 2009).

Os basidiósporos do *M. pernicioso* não têm grande disseminação. No entanto, devido à curta distância entre as árvores da plantação de cacau, a disseminação tornou-se mais devastadora. As pessoas que transitam nas regiões infectadas também contribuíram para a propagação da vassoura-de-bruxa, podendo ser consideradas como os principais vetores de transmissão da praga (GRIFFITH et al, 2003).

1.4 MÉTODOS PARA CONTROLE DA VASSOURA-DE-BRUXA

Com objetivo de criar novas formas de controle da praga, pesquisadores de várias instituições iniciaram o projeto genoma do *M. pernicioso*. Este projeto identifica genes muito importantes relacionados ao metabolismo do fungo, e/ou ao seu mecanismo de infecção. Muitos desses genes codificam enzimas e receptores essenciais para *M. pernicioso* e são considerados alvos moleculares para o desenvolvimento de fungicidas mais potentes e seletivos contra esse fungo. Adicionalmente, o entendimento do funcionamento do metabolismo do fitopatógeno a partir dos dados moleculares poderá levar ao desenvolvimento de diversas estratégias de controle da praga (PEREIRA, 2011).

Vários esforços foram utilizados para tentar conter a expansão da vassoura-de-bruxa na Bahia, no entanto, boa parte destes falharam devido a muitas razões, sendo a falta de resistência genética durante os primeiros contatos com a praga. A redução do avanço da praga tem sido feita utilizando medidas básicas e praticas de agricultura como podas fitossanitárias, fertilização ou aplicação de fungicidas cúpricos. O aumento de preços dos fungicidas aliado ao valor de aplicação tem inviabilizado esta prática para a maioria dos agricultores (MEDEIROS et al, 2010).

Atualmente o Manejo Integrado de Pragas (MIP) é o método recomendado pela CEPLAC (Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira) aos agricultores brasileiros. O MIP é constituído de quatro a seis aplicações de fungicidas cúpricos, duas a quatro podas fitossanitárias das vassouras por ano e também aplicações do fungo *Trichoderma stromaticum* como medida de biocontrole (RUDGARD, BUTTLE, 1987; ALMEIDA, COSTA, MENDONÇA, 2003; MEDEIROS et al, 2010). No entanto, pode-se constatar que tais medidas não são amplamente adotadas pelos agricultores, visto o seu custo ser

demasiadamente alto (MIDDLEJ, SANTOS, 2007). As medidas fitossanitárias apresentam eficácia somente quando aplicadas sobre uma ampla área geográfica (RUDGARD, BUTTLE, 1987). Esforços têm sido voltados para a busca de medidas alternativas para o controle efetivo da vassoura-de-bruxa, podendo ir desde a racionalização do uso dos fungicidas cúpricos (ainda muito caros) a redução da frequência de realizações do saneamento vegetal (COSTA et al, 2009; MEDEIROS et al, 2010).

O surgimento dos fungicidas sistêmicos, principalmente daqueles com atividade contra fungos da classe dos basidiomicetos, criou novas perspectivas para o controle da vassoura-de-bruxa, não só em frutos, como também em lançamentos foliculares e almofadas florais. Os primeiros a mostrar atividade *in vivo* pertencem ao grupo dos triazóis. Os fungicidas do grupo dos triazóis têm se destacado não só em ensaios de laboratório e casa-de-vegetação, como também, e principalmente, em condições de campo. O fungicida tebuconazol foi o que mostrou os melhores resultados em uma série de experimentos realizados na região cacauieira da Bahia, dados estes que motivaram sua recomendação no controle da vassoura-de-bruxa tanto em viveiros quanto em campo. As estrobilurinas são um grupo de antifúngicos que também tem mostrado bons resultados, com destaque para a azoxiestrobina; pode-se obter um controle efetivo em almofadas florais e lançamentos foliculares, mas pouca efetividade em frutos infectados. (OLIVEIRA, LUZ, 2005)

Além das medidas ligadas a aplicação de antifúngicos e poda fitossanitária, a pesquisa por variedades resistentes, indução de resistência do hospedeiro e a busca de fungos antagonistas ao *M. perniciosa*, constituem algumas das linhas mais promissoras para o controle da vassoura-de-bruxa, constituindo-se uma forma de menor impacto ambiental e mais econômica (COSTA et al, 2009).

Pesquisas com a microbiota associada à vassoura-de-bruxa do cacauieiro mostraram que o controle biológico do *M. perniciosa*, durante a sua fase saprofítica, é possível pela utilização de fungos antagonistas e competidores. Resultados promissores foram obtidos com o fungo *Trichoderma stromaticum* para o biocontrole do fungo causador da vassoura-de-bruxa. O biocontrole reduz o crescimento, esporulação e propagação dos patógenos que afetam o cacau, através do micoparasitismo direto ou por meio da produção de metabólitos ativos (MEDEIROS et al, 2010).

A utilização de microrganismos antagonistas envolvendo diferentes mecanismos de ação como competição, antibiose e hiperparasitismo, poderia desempenhar um importante papel para o desenvolvimento de um programa de controle integrado da praga, destacando a

correlação destas medidas com o controle fitossanitário e químico. Bastos, Evans e Samson (1981) em seu trabalho demonstrou que *Cladobtryum amazonense* Bastos, Evans et Samson (fungo encontrado hiper-parasitando basidiocarpos de *C. pernicioso*) produzia um composto com propriedades antibióticas, bloqueando assim o desenvolvimento micelial e germinativo dos basidiósporos, resultados estes obtidos em experimento *in vitro*. Resultados envolvendo condições de campo ainda estão em curso (OLIVEIRA, LUZ, 2005).

1.4.1 Alvos moleculares no *M. pernicioso* para o desenvolvimento de novos fármacos.

No passado o desenvolvimento de novos fármacos era advindo com a descoberta inicial da droga, posteriormente partia-se para elucidar o alvo desse composto no organismo. Atualmente, a descoberta do alvo molecular representa um direcionamento maior no estudo; conhecer como a biomacromolécula funciona fornece dados importantes como o agonista ou anátagonista deve se comportar, com isso o desenvolvimento de um novo ligante fica mais seletivo e direcionado (PATRICK, 2009)

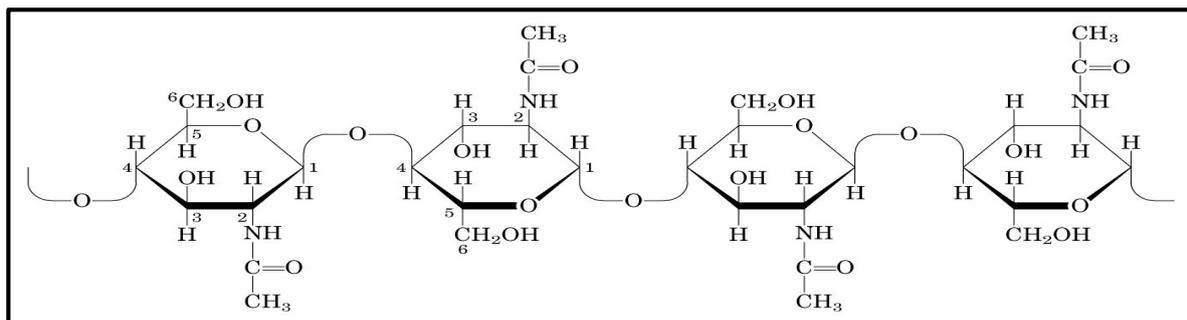
A atuação de drogas sobre fungos envolve os seguintes locais de ação: a) Síntese da parede celular; b) Alteração da membrana plasmática; c) Síntese do ergosterol; d) Divisão celular; e) Síntese de ácidos nucléicos; f) Síntese proteica; g) Inibidores metabólicos (REANKAR, GRAYBILL, 2003). No controle efetivo da vassoura-de-bruxa, a rota metabólica que leva a síntese da quitina é um alvo potencial para o desenvolvimento de novos antifúngicos. A inibição da síntese de quitina pode levar a sérias implicações ao fungo, como sua morte celular (OLSEN; RODERICK, 2001; PIROVANI et al, 2005).

Células fúngicas destituídas de parede celular somente sobrevivem em condições de laboratório, onde o suporte osmótico previne a sua lise. Estes dados sugerem a parede celular como um importante alvo na busca de uma droga que possa atuar como fungicida, justificada pela importância da parede celular para os fungos, vale ressaltar que esta estrutura não está presente em mamíferos, o que pode garantir maior seletividade para o fungo e baixa toxicidade para os seres humanos. Conseqüentemente, as rotas biossintéticas das moléculas que compõem a parede celular são alvos importantes para o desenvolvimento de agentes inibidores do crescimento destes patógenos (GEORGOPAPADAKOU, TKACZ, 1995; RONCERO, 2002).

Nos fungos filamentosos, a quitina é o maior componente da parede celular atuando de forma marcante para a manutenção da integridade celular (TAKAYA et al, 1998). A quitina é

um homopolissacarídeo composto por resíduos de N-acetil-D-glicosamina em ligação β (ou β -(1-4) 2-acetoamido-2-deoxi-D-glicose) (Figura 2) (LENHNINGER, NELSON, COX, 2000). Trata-se de uma estrutura rígida amplamente distribuída pelos invertebrados, fungos e algas conferindo a força necessária para proteger a célula de choques osmóticos (TRABULSI, 1999; TAKAYA et al., 1998).

Figura 2: Segmento de quitina com unidades de N-acetil-D-glicosamina em ligações β (1-4).



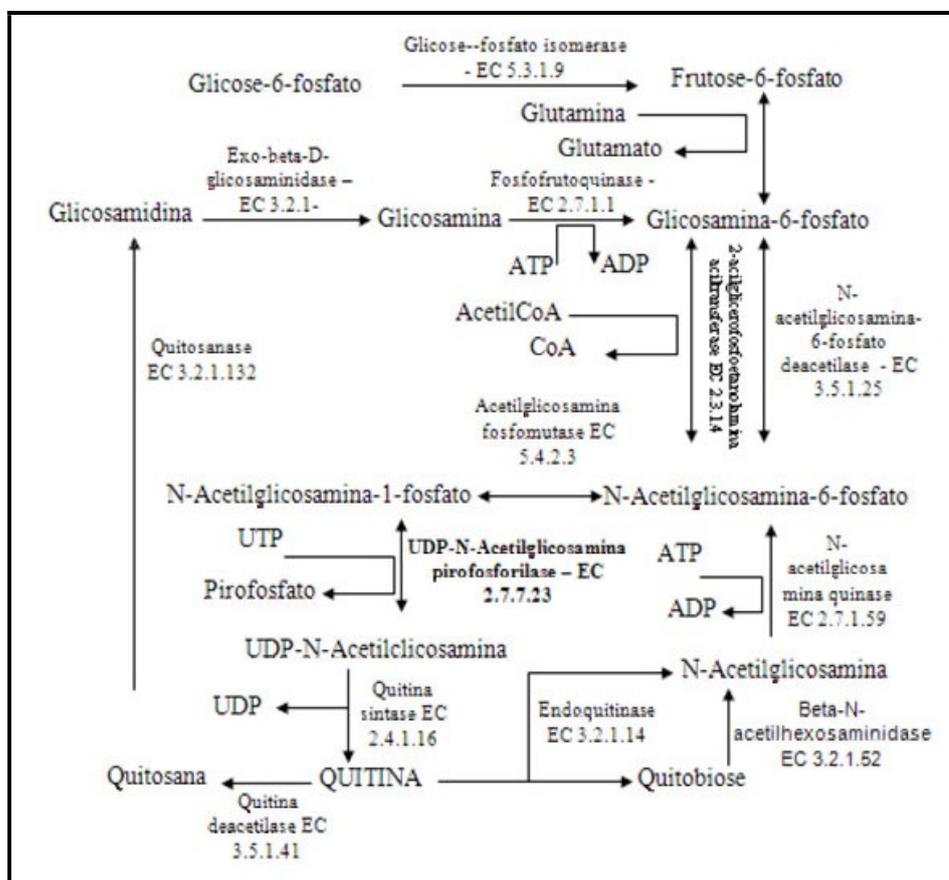
Fonte: LENHNINGER, NELSON; COX, 2000.

A ocorrência de quitina, em organismos como nematódeos, moluscos, insetos e na parede celular de fungos e algumas algas, leva o metabolismo de quitina a ser um excelente alvo para o desenvolvimento de estratégias para o controle da disseminação de pestes (KRAMER; MUTHUKRISHNAN, 1997).

Apesar da quitina ser um dos mais importantes biopolímeros da natureza, o conhecimento da sua biossíntese ainda é fragmentado, até o presente momento se conhece quatro etapas (Figura 3): (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) (PIROVANI et al, 2004, MIO et al, 1998; POMPEO et al, 2001; YAMADA-OKABE et al., 2001). Desta forma, as enzimas envolvidas neste ciclo de formação da quitina podem constituir bons alvos para antifúngicos mais seletivos, para o controle da praga. Assim, pode-se constatar em alguns trabalhos que as enzimas pirofosforilase, sintase da quitina e quitinase, vem sendo estudadas com o intuito de se

descobrir novos compostos capazes de bloquear ou controlar o crescimento do fungo responsável pela vassoura-de-bruxa. (SANTOS JUNIOR et al, 2011; SOUZA et al, 2009; GALANTE, 2008).

Figura 3: Metabolismo de quitina



Fonte: Adaptado de Pirovani et al., 2004.

A enzima UDP-N-acetilglicosamina pirofosforilase (EC 2.7.7.23) é uma proteína que pertence à superfamília nucleotídeos-difosfo-açúcar transferase e a família UDP-glicose pirofosforilase. Esta enzima é constituída de folhas beta paralela (beta/alfa/beta) segundo a Structural Classification of Protein Database- SCOP (RSCB, 2011). Sua purificação foi realizada a partir de cepas de *Staphylococcus aureus* cerca de 30 anos atrás. No entanto, a seqüência gênica que codifica esta enzima foi elucidada a partir de genes de *Escherichia coli*, somente em 1993 (DE LUCA et al. 1996; SANTOS JUNIOR, 2007).

Recentemente Santos Junior et al (2011) determinaram a estrutura 3D da pirofosforilase, uma das enzimas da via metabólica da síntese de quitina. Para a construção do modelo seguiu-se o seguinte protocolo: 1- identificação e seleção da(s) proteína(s) molde(s) e

alinhamento das seqüências de resíduos; 2- análise estrutural da proteína molde identificada; 3- refinamento da proteína molde; 4- construção do modelo; 5- validação do modelo. Durante os estudos foi possível observar que a proteína molde utilizada apresentava uma falha estrutural em 15 aminoácidos, esta falha foi corrigida e a proteína molde foi utilizada para a construção do modelo 3D. Foi possível construir um modelo com boas qualidades geométricas e boa estabilidade, este modelo foi então submetido a estudos de ancoragem molecular, com o objetivo de se analisar a energia de ligação entre os substratos e a enzima. Com os estudos de ancoragem, utilizando-se o modelo, foi possível perceber que a pirofosforilase do fungo *M. pernicioso* não apresenta um bolsão hidrofóbico muito comum em pirofosforilases de outros organismos. Esta informação deve ser levada em conta durante o desenvolvimento do novo fungicida derivados nucleosídeos.

Um outro alvo molecular para o controle do fungo *M. pernicioso* é a sintase da quitina (E.C. 2.4.1.16) uma enzima que desempenha importantes funções na diferenciação e morfogênese de fungos filamentosos, como o *M. pernicioso*, que possuem a quitina como principal componente estrutural de sua parede celular (RUIZ-HERRERA et al., 2002; SOUZA, 2007). Para a sua atividade, essa enzima utiliza um cátion bivalente (Mn^{+2} ou Mg^{+2}) (MERZENDORFER, 2006) e o nucleotídeo UDP-GlcNAc, como doador de açúcar (MULLER et al, 2002). A sintase da quitina pertence à família multigênica das glicosiltransferases. (MERZENDORFER, 2006).

A caracterização gênica e modelagem do provável sitio catalítico da sintase da quitina realizado por Souza (2007), objetivaram-se a caracterização molecular experimental e *in silico* do gene da sintase da quitina de *M. pernicioso*, (MopCHS), um provável homólogo do gene *chs1* do *Agaricus bisporus*. Os contigs de *M. pernicioso* foram mapeados com uma cobertura de aproximadamente 80%, no produto gênico de *A. bisporus* com alta significância estatística, e pares de oligonucleotídeos iniciadores foram produzidos para garantir a amplificação para o sequenciamento de dois intervalos do provável gene MopCHS por primer walking. Após o sequenciamento completo do gene, que compreende 3443 pb (éxons e íntrons), constituindo um cDNA com uma fase de leitura aberta com 2734 pb e codificando uma proteína com 913 aminoácidos, um modelo de provável sitio ativo foi construído pelo método de modelagem por homologia (SOUZA et al, 2009).

A quitina é degradada a 2-acetamido-2-deoxi- β -D-glicosamina (N-acetilglicosamina – GlcNAc) por quitinases (EC 3.2.1.14) (FELSE, PANDA, 1999; DUO-CHUAN, 2006; DAHIYA et al., 2006). Enzimas quitinolíticas são amplamente encontradas em uma variedade

de organismos, incluindo bactérias, fungos, plantas, invertebrados (principalmente nematóides, insetos e crustáceos) e todas as classes de vertebrados (WATANABE et al., 1991; PERRAKIS et. al., 1994; MIO et. al., 1998; HOWARD et. al., 2003). Em fungos, as quitinases desempenham uma variedade de funções como, a digestão da parede celular, a formação de septos, a germinação e a diferenciação de esporos, o crescimento e a autólise de hifas (KIM et al., 2003; SELVAGGINI et al., 2004; DUO-CHUAN, 2006).

1.5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Grandes impactos na cultura cacaeira na Bahia são provocados pela vassoura-de-bruxa, que vem causando a queda de produção, aumento dos custos e gastos diretos em função do uso de medidas de controle, afetando diretamente o produtor e o preço do produto, atingindo de forma indireta o consumidor. Além de impactos sócios econômicos resultantes da menor produção de cacau, outras mudanças ocorrem na região produtora da Bahia, como: uso da terra, venda de propriedades, nível de emprego e danos ao meio ambiente. Sendo assim, é de grande importância o desenvolvimento racional de novos antifúngicos de baixo peso molecular baseando-se na obtenção de substâncias detectadas por screening bioquímico completo, para que se venha desenvolver antifúngicos mais eficazes, afim de combater a vassoura-de-bruxa.

A elucidação estrutural de alvos moleculares tem sido uma das principais ferramentas para o desenvolvimento racional de novos fármacos. Tendo em mãos a conformação espacial de um receptor é possível prever qual a estrutura do novo ligante, e com isso há um planejamento racional deste composto protótipo. Desta forma há um ganho de tempo significativo e uma redução nos custos das pesquisas.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, L.C.C.; COSTA, A.Z.M.; MENDONÇA, R.C.S. Efeito do número de remoções de partes doentes do cacauero e número de aplicações de óxido cuproso no controle da vassoura-de-bruxa na Bahia. *Agrotropica*. n. 15, p. 79-84.

BASTOS, C.N., EVANS, H.C., SAMSON, R.A. A new hiperparasitic fungus, *Cladobryum amazonense*, with potencial for control of fungal pathogens of cocoa. *Transactions of the British Mycological Society*. n. 77, p. 273-278, 1981.

BOTANISCHER GARTEN, 2007. **Theobroma cacao**. Disponível em: <http://www.botanik.uni-karlsruhe.de/garten/fotos-knoch/Theobroma%20cacao%20Echter%20Kakaobaum%207.jpg>. Acesso em: 14 mar. 2007.

BRANDEAU, J. El cacao. Barcelona: Blume, 1992.

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.

COSTA, J.C.B. et al. Controle biológico da vassoura-de-bruxa do cacauero da Bahia, Brasil. In: BETTIOL, W. Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas. Jaguariúna: Embrapa meio ambiente, 2009, p. 245-266.

DAHIYA, N.; TEWARI, R.; TIWARI, R.P.; HOONDAL, G.S. Biotechnological aspects of chitinolytic enzymes: a review. *Applied Microbiology and Biotechnology*. v. 71, p. 773-782, 2006.

DE LUCA, C. et al. Overexpression, one-step purification and characterization of UDP-glucose dehydrogenase and UDP-N-acetylglucosamine pyrophosphorylase. *Bioorganic e Medicinal Chemistry*. v. 4, n.1, p. 131-142, 1996.

DUO-CHUAN, L.; CHEN, S.; JING, L.U. Purification and partial characterization of two chitinases from the mycoparasitic fungus *Talaromyces flavus*. *Mycopathologia*. v. 159, p. 223-229, 2005.

FELSE, P.A. e PANDA, T. Studies on applications of chitin and its derivatives. *Bioprocess Engineering*. Vol. 20, p. 505-512, 1999.

GALANTE, R.S. Estudos de quitinases de *Moniliophthora perniciosa* (Stahel) Aime & Phillips-Mora, fungo causador da vassoura-de-bruxa no cacauero: purificação, caracterização e modelagem comparativa. 2008. 90f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia). Universidade Estadual de Feira de Santana, 2008.

GARCIA, O. et al. Characterization of necrosis and ethylene-inducing proteins (NEP) in the basidiomycete *Moniliophthora perniciosa*, the causal agent of witches' broom in *Theobroma cacao*. *Mycological research III*, p. 443-455, 2007.

GEORGOPAPADAKOU N.H.; J.S. TKACZ. The fungal cell wall as a drug target. *Trends Microbiology*. v. 3, n. 3: p. 98-104, 1995.

GRIFFITH, G. W. et al. Witches' brooms and frosty pods: two major pathogens of cacao. *New Zealand Journal of Botany*. v. 41, p. 423-435, 2003.

HOWARD, M.B.; EKBORG, N.A.; WEINER, R.M.; HUTCHESON, S.W. Detection and characterization of chitinases and other chitin-modifying enzyme. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. Vol. 30, p. 627-635, 2003.

KILARU, A., HASENSTEIN, K. H. Development and Pathogenicity of the Fungus *Crinipellis perniciosae* Interaction with Cacao Leaves. *Biochemistry and Cell Biology*. v. 95, n. 1, p. 101-107, 2005.

KRAMER, K. J.; MUTHUKRISHNAN, S. Insect chitinase: molecular biology and potential use as biopesticides. *Insect Biochemistry Molecular Biology*, v. 27, n. 11, p. 887-900, 1997.

KIM, K.-J.; YANG, Y.-J.; KIM, J.-G. Purification and Characterization of Chitinase from *Streptomyces* sp. M-20. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, v. 36, n. 2, p. 185-189, 2003.

LANA, T. G. Caracterização genética e fisiológica de *Crinipellis perniciosae*. 2000. 106p. Tese (doutorado) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. *Princípios de bioquímica*. 3. ed. Sao Paulo: Sarvier, 2002. 975p.

MEDEIROS, F.H.V. et al. A novel, integrated method for management of witches' broom disease in Cacao in Bahia, Brazil. *Crop Protection*. n. 29, p.704-711, 2010.

MERZENDORFER, H. Insect chitin synthases: a review. *Journal of Comparative Physiology B*. v. 176: p. 1-15, 2006.

MIDDLEJ, R.R.; SANTOS, A.M. Economia do cacao. In: VALLE, R.R. (Ed.). *Ciência, tecnologia e manejo do cacauero*. CEPLAC, Ilheus, Brasil, 2007, p. 422-458.

MIO, T. et al. The eukaryotic UDP-N-Acetylglucosamine pyrophosphorylases. *The Journal of Biological Chemistry*. v. 273, n. 23, p. 14392-14397, 1998.

MULLER, C., HJORT, C. M., HANSEN, K., NIELSEN, J. Altering the expression of two chitin synthase genes differentially affects the growth and morphology of *Aspergillus oryzae*. *Microbiology*, v. 45, p. 4025-4033, 2002.

NEW CROP, 2007. *Tropical Beverage Crops-Cacao*. Disponível em: http://www.hort.purdue.edu/newcrop/tropical/lecture_18/lec_18.html. Acesso: 14 mar. 2007.

ODJAKOVA M. E.; HADJÜVANOVA, C. 2001. The complexity of pathogens defense in plants. *Bulg. Journal of Plant Physiology*. v. 27, n.1-2: p. 101-109, 2001.

OLIVEIRA, M.L.; LUZ, E.D.M.N. Vassoura-de-bruxa. In: _____. *Identificação e manejo das principais doenças do cacauero no Brasil*. Ilheus, CEPLAC/CEPEC/SEFIT, 2005, p. 15-33.

- ORCHARD, J., GOLLIN, H. A., HARDWICK, K., ISAAC, S. Changes in morphology and measurement of cytokinin levels during the development of witches-brooms on cocoa. *Plant pathology*. N. 43, p. 65-72, 1994.
- PATRICK, G. L. Drug discovery: finding a lead. In _____: An introduction to medicinal chemistry. 4. ed. Oxford: New York: Oxford University Press, 2009. p. 187-212.
- PERRAKIS, A., TEWS, I., DAUTER, Z., OPPENHEIM, A. B., CHET, I., WILSON, K. S., VORGIAS, C. E. Crystal structure of a bacterial chitinase at 2.3 Å resolution. *Structure*, v. 2, p. 1169, 1994.
- PEREIRA, G. A. G. **O projeto genoma de *Crinipellis pernicioso*, fungo causador da vassoura-de-bruxa: Fundamentos e potencial contribuição. Disponível em: <http://www.lge.ibi.unicamp.br/vassoura/>. Acesso em 14 de Julho, 2011.**
- PEREIRA, J. L. et al. First occurrence of witches' broom disease in the principal cocoa-growing region of Brazil. *Tropical Agriculture*, v. 67, n. 2, p. 188-189, 1990.
- PIROVANI, C. P. ; OLIVEIRA, B. M. ; DIAS, C. V. ; SANTOS JUNIOR, M. C. ; HORACIO JUNIOR, B. T. ; SOUZA, C. S. ; UETANABARO, A. P. T. ; TARANTO, A. G. ; LOPES, M. A. . Knowledge Discovery in Genome Database: The chitin metabolic pathway in *Crinipellis pernicioso* (Stahel) Singer. In: Proceedings of the fourth brazilian symposium on mathematical and computational biology, 2005, Rio de Janeiro. Proceedings of the fourth brazilian symposium on mathematical and computational biology. Rio de Janeiro : e-papers, 2005. v. 1. p. 122-139
- 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. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 276, p.3833-3839, 2001.
- PURDY, L. H. Fungal Disease of Cacao. **Disponível em: <http://www.cabi-commodities.org/Acc/ACCrc/PDFFiles/W-BPD/Ch1.pdf>**. Acesso em: 25 abr 2007.
- PURDY, L. H.; SCHMITDT, R. A. Status of cacao witches' broom: biology, epidemiology and management. *Annual Review of Phytopathology*, v. 34, p. 573-594, 1996.
- REANKAR, S. J.; GRAYBILL, R. Antifungal therapy. In: ANALISSIE, E. J.; MCGINNIS, M.R.; FALLER, H. *Clinical Micology*. Churchill & Livingstone, New York, 2003.
- RINCONES, J. et al. Genetic variability and chromosome-length polymorphisms of the witches' broom pathogen *Crinipellis pernicioso* from various plant hosts in South America. *Mycological Research*, p. 821-832, 2006.
- RSCB, 2011. RSCB Protein Data Bank. **Disponível em: <http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=1JV1>**. Acesso em: 25 abr 2011.
- RUBINI, M. R. et al. Diversity of endophytic fungal community of cacao (*Theobroma cacao* L.) and biological control of *Crinipellis pernicioso*, causal agent of Witches' broom disease. *International Journal of Biological Sciences*, n. 1, p. 24-33, 2005.

RUDGARD, S.A.; BUTLER, D.R. Witches' broom disease on cocoa in Rondonia, Brazil: pod infection in relation to pod susceptibility, wetness, inoculum, and phytosanitation. *Plant Pathology*. n. 36, p.512-522, 1987.

RUIZ-HERRERA, J., GONZÁLEZ-PRIETO, J. M., RUIZ-MEDRANO, R. Evolution and phylogenetic relationships of chitin synthases from yeast and fungi. *FEMS Yeast Research* v.1, p.247-256, 2002.

SANTÉN K. 2007. Pathogenesis-related proteins in Barley: localization and accumulation patterns in response to infection by *Bipolaris sorokiniana*. Tese de doutorado. Swedish, University of Agricultural Science, Alnarp.

SANTOS JUNIOR, M. C. et al. Purification, characterization and structural determination of UDP-*N*-acetylglucosamine pyrophosphorylase produced by *Moniliophthora perniciosa*. **Journal of Brazilian Chemistry Society**. v. 22, n. 6, p.1015-1023, 2011.

SANTOS JUNIOR, M. C. Determinação estrutural da enzima pirofosforilase do fungo *Moniliophthora perniciosa* (Stahel) (Singer) Phillips-Mora por modelagem comparativa. 2007. 83f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia). Universidade Estadual de Feira de Santana, 2007.

SCARPARI, L.M., MEINHARDT, LW, MAZZAFERA, P., POMELLA, A.W.V, SCHIAVINATO, M.A, CASCARDO, J.C.M., PEREIRA, G.A.C. 2005. Biochemical changes during the development of witches' broom: the most important disease of cocoa in Brazil caused by *Crinipellis perniciosa*. *Journal Experimental Botany*. p. 1-13.

SEVALGGINI, S.; MUNRO, C. A.; PASCHOUD, S.; SANGLARD, D.; GOW, N. A. R. Independent regulation of chitin synthase and chitinase activity in *Candida albicans* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology*. Vol. 150, p. 921–928, 2004.

SOUZA, C.S. et al. Identification and Characterization of *Chitinase* Class III Chitin Synthase Gene of *Moniliophthora perniciosa*, the Fungus That Causes Witches' Broom Disease of Cacao. **The Journal of Microbiology**, v. 47, n. 4 2009

SOUZA, C.S. Sintase da quitina de *Moniliophthora perniciosa* (Stahel) Aime & Phillips-Mora: caracterização gênica e modelagem do provável sítio catalítico. 2007. 90f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia). Universidade Estadual de Feira de Santana, 2007.

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

TRABULSI, L. R. et al. *Microbiologia*. 3. ed. São Paulo: Atheneu, 1999.

TREBITSH, T., GOLDSCHMIDT, E.E., RIOV, J. Ethylene induces de novo synthesis of chlorophyllase, a chlorophyll degrading enzyme, in citrus fruit peel. *Proceedings of the national academy of sciences*. n. 90, p. 9441-9445, 1993

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* *European Journal of Biochemistry*, v. 268, p. 2498-2505, 2001.

WATANABE, T. OYANAGI, W.; SUZUKI, K.; OHNISHI, K.; TANAKA, H. Structure of the gene encoding chitinases D of *Bacillus circulans* WL-12 and possible homology of the enzyme to other prokaryotic chitinases and class II plant chitinases. *Journal of Bacteriology*. Jan., p. 408-414, 1992.

CAPÍTULO 2

CARACTERIZAÇÃO DA UDP-N-ACETILGLICOSAMINA
PIROFOSFORILASE

2.1 INTRODUÇÃO

A UDP-N-acetilglicosamina difosforilase (E.C. 2.7.7.23), também conhecida como N-acetilglicosamina-1-fosfato uridiltransferase e UDP-N-acetilglicosamina pirofosforilase é uma enzima bifuncional envolvida na síntese da UDP-N-acetilglicosamina (UDPNAcGlc), um precursor essencial para a biossíntese de peptidoglicano e lipopolissacarídeos, em bactérias gram positivas e negativas, como também para a formação da quitina em fungos (ENZYME, 2011; EXPLORENZ, 20011; ROGERS, 2011; DEACON, 2005).

A UDP-N-acetilglicosamina pirofosforilase (UNAcP) catalisa as últimas reações para a biossíntese do UDPNAcGlc, a transferência do grupamento uridil, proveniente do UTP, para a N-acetilglicosamina-1-fosfato, tendo como cofator um cátion divalente como o Mg^{2+} e como subproduto há a liberação de fosfato inorgânico (PPi) (KOSTREWA et al, 2001; MIO et al, 1998; STROMINGER, SMITH, 1959).

Em eucariontes, duas enzimas diferentes catalisam reações equivalentes, a glicosamina-6-fosfato acetiltransferase, que utiliza glicosamina-6-fosfato como substrato, e a UDP-N-acetilglicosamina pirofosforilase. Sendo a UNAcP essencial para a sobrevivência e desenvolvimento de alguns organismos procariontes (bactérias) e eucariontes (fungos), pode-se considerá-la como um alvo atrativo para o desenvolvimento de novos antibióticos (KOSTREWA et al, 2001; MARUYAMA et al, 2007).

UDP-N-acetilglicosamina (UDPNAcGlc), a forma ativada da N-acetilglicosamina, é o precursor chave para reações de glicosilação, carboidratos O- ou N- ligados a proteínas controlam uma série de funções nas células, que incluem o reconhecimento celular a transporte de nutrientes (HART et al, 2007). Observa-se também que o UDPNAcGlc é essencial para a síntese de quitina (maior componente da parede celular dos fungos) e de glicosilfosfatidilinositol (âncora de proteínas da face externa da membrana plasmática) (HERSCOVICS, ORLEAN, 1993; SILVERMAN et al, 1988; PENEFF et al, 2001). Em bactérias o UDPNAcGlc representa um precursor essencial para a biossíntese do peptidoglicano e lipopolissacarídeos (SNYDER, CHAMPNESS, 2007; MARUYAMA et al, 2006).

A biossíntese do UDPNAcGlc pela UNAcP ocorre no citoplasma, como a reação é reversível a enzima também pode ser chamada de N-acetilglicosamina-1-fosfato uridiltransferase, tanto na reação anabólica quanto catabólica há a necessidade de um íon

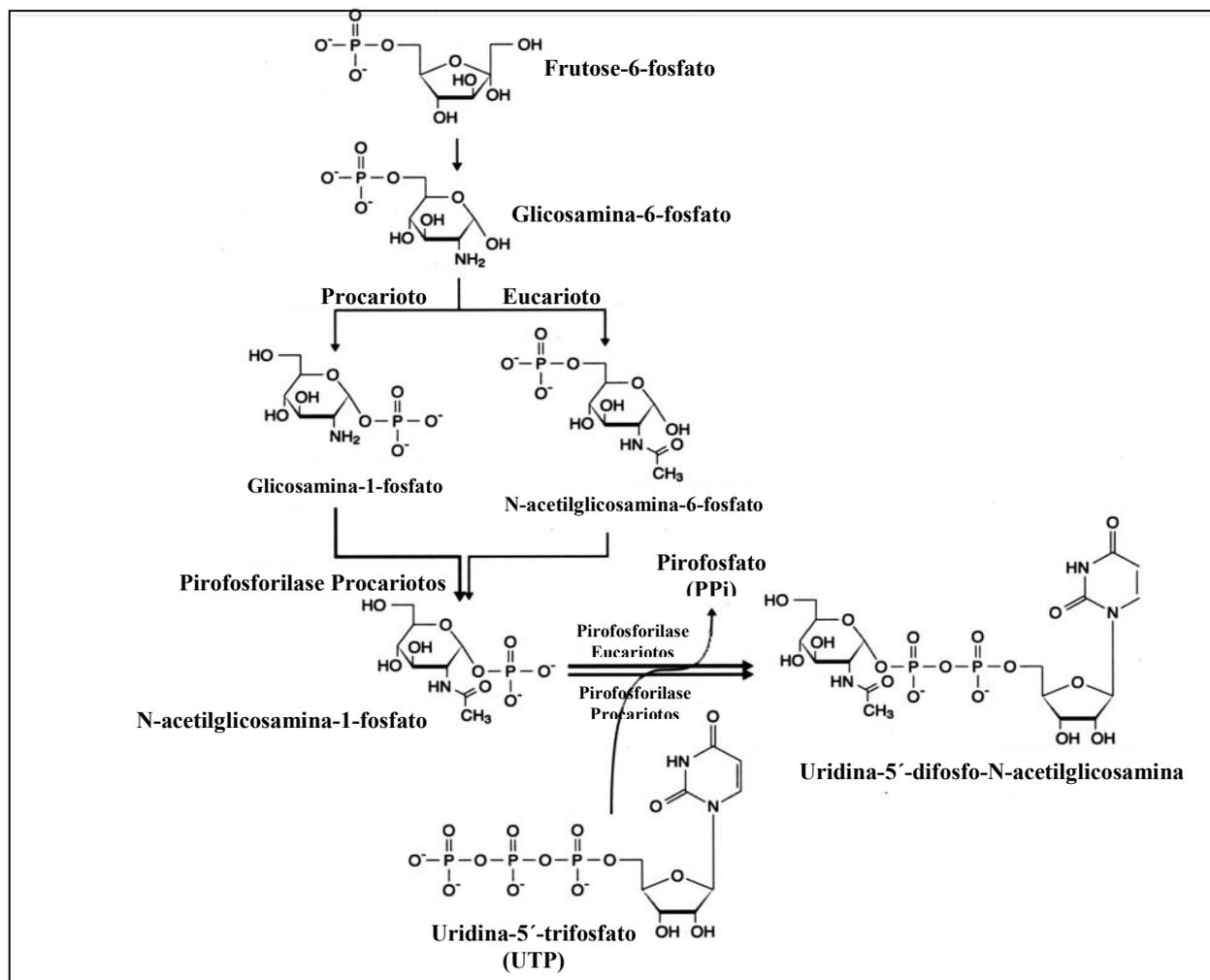
divalente (PNEFF et al, 2001; SANTOS JUNIOR et al, 2011). A estrutura cristalina da UNAcP foi determinada em muitas espécies, o que se tem relatado é que a enzima pode ser dividida em dois domínios principais correspondentes a duas funções: o domínio de acetilação e o de pirofosforilação (KOSTREWA et al, 2001; OLSEN, REODERICK, 2001; BROWN et al, 1999; MARUYAMA et al, 2006), em contraste com a UNAcP de procariotos, a UNAcP de eucariotos catalisa somente a pirofosforilação (MURYAMA et al, 2006).

Segundo a *Structural Classification of Protein Database-SCOP* (RSCB, 2000a) a UNAcP pertence à superfamília nucleotídeos-difosfo-açúcar transferase e a família UDP-glicose pirofosforilase. Esta enzima é constituída de folhas beta paralela (beta/alfa/beta). Sua purificação foi realizada a partir de cepas de *Staphylococcus aureus* cerca de 30 anos atrás. No entanto, a seqüência gênica que codifica esta enzima foi elucidada a partir de genes de *Escherichia coli*, somente em 1993 (DE LUCA et al. 1996). Devido a importância da enzima para a sobrevivência de bactérias e fungos esta enzima tem atraído muito a atenção da indústria farmacêutica, pois a mesma pode ser um bom alvo para o desenvolvimento de novos antibióticos, com isso, este trabalho teve como objetivo realizar um levantamento bibliográfico sobre a enzima UNAcP, enfocando os aspectos importantes para o entendimento sobre as principais características da enzima, constituindo assim uma fonte de dados sobre a mesma para futuros estudos.

2.2 REAÇÃO CATALISADA

A UNAcP de procariotos e eucariotos não apresenta alta similaridade em sua sequência de aminoácidos (cerca de 10%), exceto, no entanto, pelo sítio ativo, o qual apresenta-se semi-conservado, seguindo a sequência de Met/Leu-X₂-Gly-X-Gly-Thr-X-Met-X₄-Pro-Lys (BULIK, LINDMARK, JARROLL, 1998; MIO et al, 1998; PENEFF et al, 2001; OLSEN, RODERICK, 2001; WANG-GILLAM et al, 1998; MARUYAMA, et al, 2007). A figura 1 esquematiza a rota de biossíntese de UDPNacGlc mostrando as estruturas dos intermediários metabólicos para procariotos e eucariotos. Deve-se ressaltar que a UNAcP de procariotos além de catalisar a reação da UDPN-acetilglicosamina realiza também a acetilação da glicosamina-1-fosfato em N-acetilglicosamina-1-fosfato.

Figura 1: Rotas de biossíntese da UDP-N-acetilglicosamina em procariotos e eucariotos



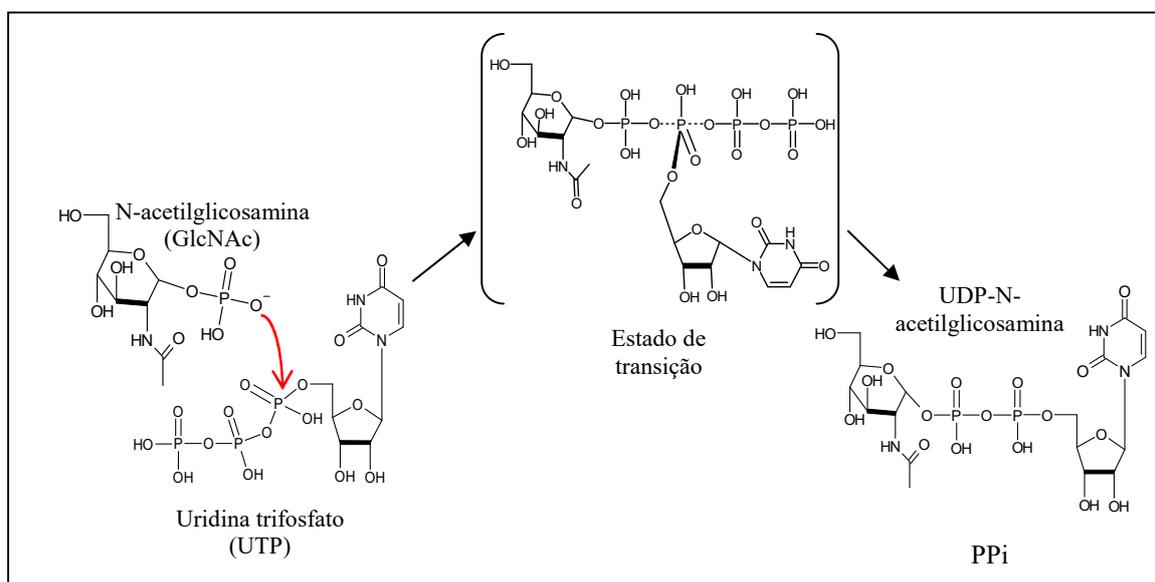
Fonte: MARUYAMA et al, 2007

A produção de UDPNAcGlc envolve uma via biosintética que tem como ponto de partida a frutose-6-fosfato (Figura 1), nesta via alguns pontos devem ser destacados, quando se refere na ação da UNAcP; primeiramente a glicosamina-6-fosfato (produto da biotransformação da frutose-6-fosfato) participa de duas vias de catálise diferentes, que dependem do organismo em que a mesma se desenvolve; em procariotos ocorre a formação da glicosamina-1-fosfato e em eucariotos ocorre a liberação de N-acetilglicosamina-6-fosfato; a glicosamina-1-fosfato é acetilada própria UNAcP em procariotos, formando assim a N-acetilglicosamina-1-fosfato; por sua vez em eucariotos a N-acetilglicosamina-6-fosfato é convertida em N-acetilglicosamina-1-fosfato pela enzima acetilglicosamina fosfomutase (EC

5.4.2.3). Por fim, a UNAcP utiliza como substratos a N-acetilglicosamina-1-fosfato e uridina-5'-trifosfato (UTP) (Figura 1) para formação do UDPNacGlc. Esta etapa final de formação do UDPNacGlc é uma reação que pode ocorrer em ambos os sentidos, tanto na formação dos produtos quanto na formação dos substratos. (PIROVANI et al, 2005;

A reação procede através do mecanismo substituição nucleofílica bimolecular (S_N2) (figura 2), 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).

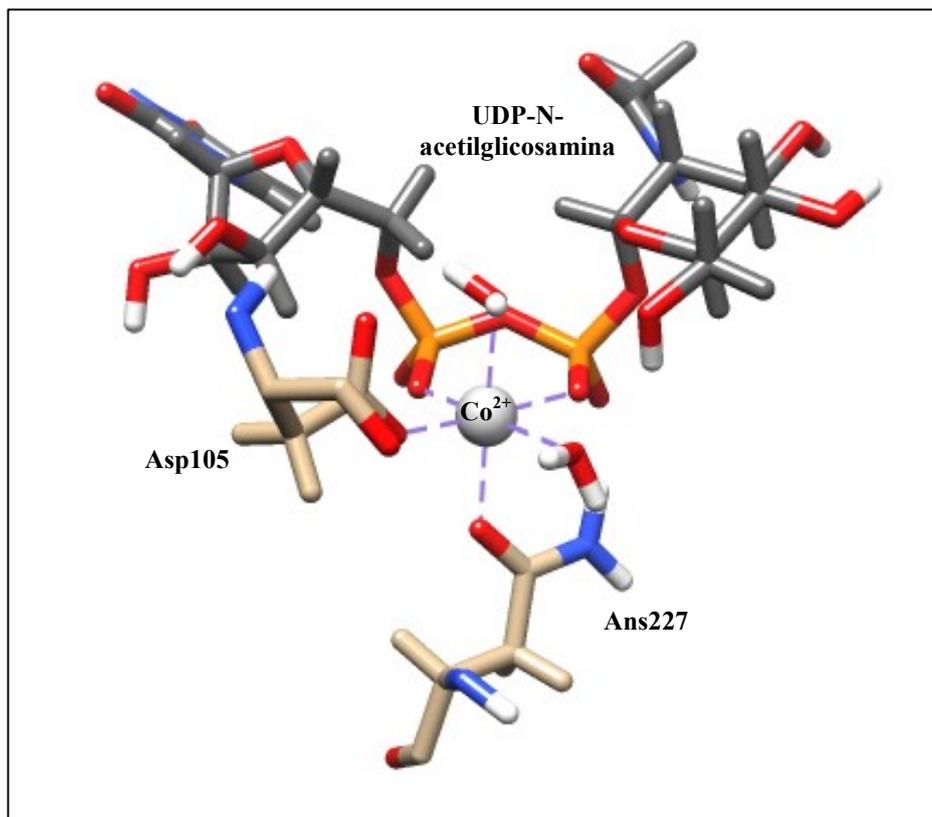
Figura 2: Reação de formação da UDP-N-acetilglicosamina via mecanismo de substituição nucleofílica bimolecular (S_N2) sugerido por alguns autores.



Fonte: adaptado de MARUYAMA et al, 2007

A presença de cátions divalentes, como íons de magnésio e cobalto, aumentam a atividade enzimática devido à sua ação estabilizadora das cargas negativas dos grupos fosfatos como pode ser evidenciado na figura 3(MARUYAMA et al, 2007).

Figura 3: Sítio ativo da UNAcP de *Escherichia coli* esquematizando o equilíbrio de cargas ocasionado pela presença do íon Co^{2+} .



Fonte: Adaptado de OLSEN, RODERICK, 2001

Com a reversibilidade da reação da UNAcP os ensaios de atividade enzimática da reação pode ser averiguado no sentido de formação dos produtos (UDP-N-acetilglicosamina + PPI) como no sentido inverso (N-acetilglicosamina-1-fosfato + UTP). Alguns experimentos usam marcação radioativa para determinação da atividade enzimática; já o ensaio inverso faz uso de técnicas espectrofotométricas para o acompanhamento da reação (SZUMILO et al, 1996).

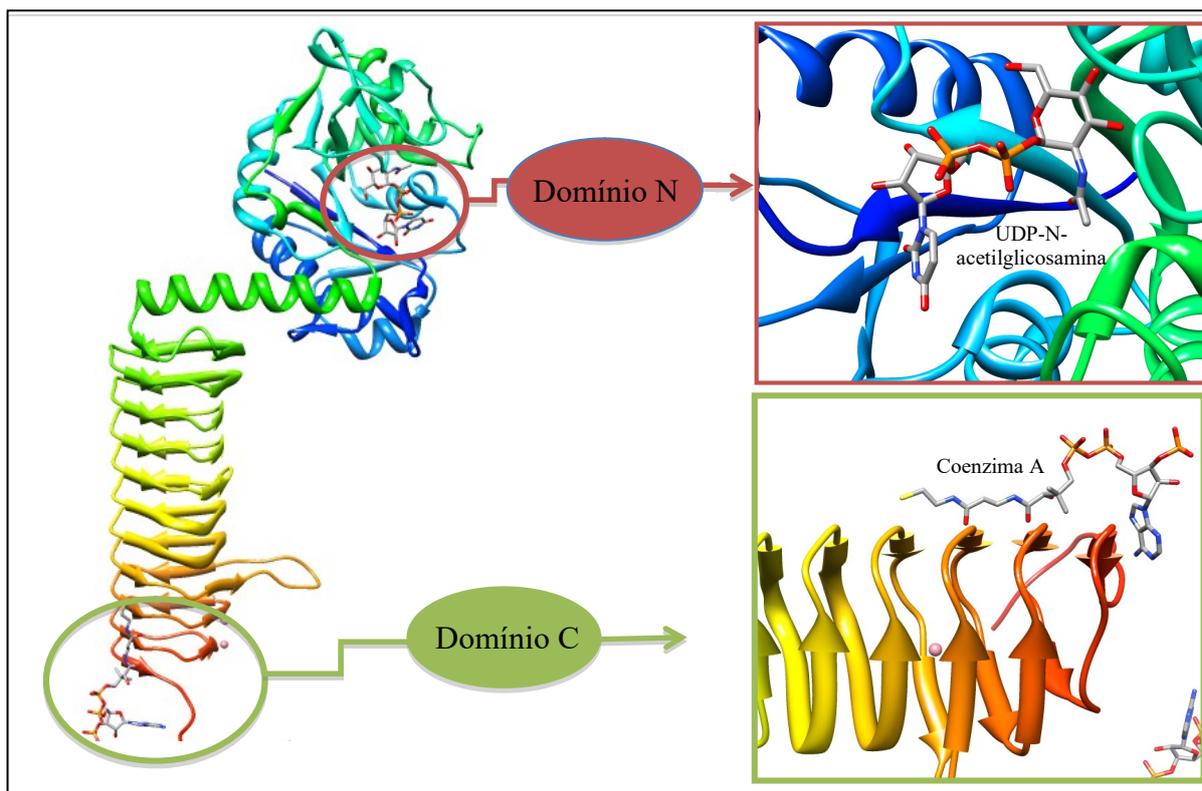
UDP-N-acetilglicosamina tem importância central em muitos organismos (OLSEN; RODERICK, 2001). Dentre suas funções, pode-se destacar: a) precursor de muitas biomoléculas, incluindo lipopolissacarídeos e peptidoglicano; b) um importante precursor de glicosilações N- e O- dirigidas, quando presentes na superfície celular. As glicoproteínas atuam como sinalizadores para o processamento de certas reações como a identificação imunológica, desenvolvimento de tumores e interações célula-célula; c) essencial para a síntese de quitina e glicosilfosfatidilinositol (componente de muitas proteínas de membrana) (PENEFF et al, 2001; MIO et al, 1998).

2.3 CARACTERIZAÇÃO PROTÉICA

A caracterização da estrutura da UNAcP deve levar em conta justamente a diversidade estrutural que a mesma apresenta, além de diferenças sutis na reação catalisada, a enzima também apresenta algumas diferenças estruturais quando se compara aquelas que são expressas em organismos procariontes e em eucariontes.

Alguns trabalhos caracterizaram o sítio ativo da UNAcP. Este sítio pode ser arbitrariamente dividido em duas regiões: 1) a região de ligação da uridina (N-terminal) do substrato UTP e 2) o sítio de ligação da N-acetilglicosamina (domínio-C) do substrato N-acetilglicosamina-1-fosfato (Figura 4). O sítio de ligação da uridina consiste de um seguimento formado pelos aminoácidos Ala12-Gly14-Arg18-Lys25-Gln76-Asp105. O sítio de ligação para o N-acetilglicosamina é formado pelos resíduos Thr82-Thr137-Gly140-Asn169-Gly171-Glu195-Thr199 (MOLCHALKIN et al 2008; OLSEN, VETTING, RODERICK, 2008).

Figura 4: Estrutura da UNAcP da *Escherichia coli* evidenciando a localização do domínio-C e região N-terminal.

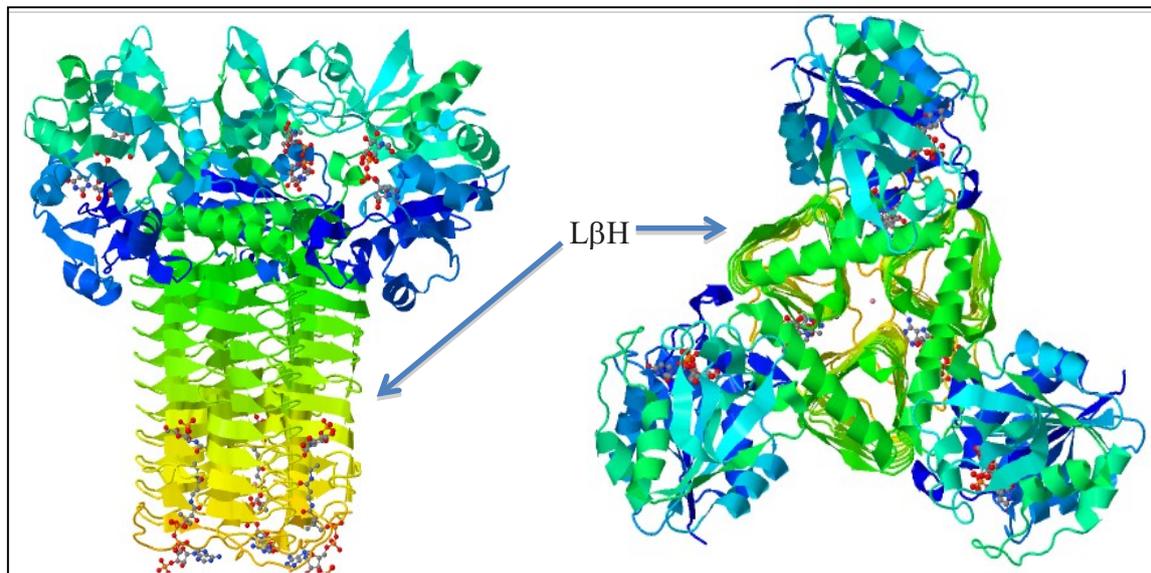


Fonte: Adaptado de MOLCHALKIN et al 2008; OLSEN, VETTING, RODERICK, 2008

Estudos de cinética demonstraram que o primeiro passo da produção do UDPNAcGlc é a reação de transferência do grupamento acetila conduzida pelo domínio-C, a acetilglicosamina-1-fosfato produzida por essa reação é liberada deste sítio ativo, onde posteriormente se liga ao domínio N-terminal. Aparentemente, não há um substrato intermediário entre esses dois sítios ativos. (GEHRING et al, 1996).

A estrutura cristalina do domínio-C (acetiltransferase heptapeptídeo) apresenta uma conformação característica conhecida como L β H (*Left-handed β -helix*) e ou trimérico ou hexamérico (dímeros de trimeros) em estruturas oligoméricas (Figura 5). Em todos os casos, o domínio-C é formado pela junção de dois domínios L β H adjacentes, podendo em alguns casos levar a três, aparentemente, independentes domínios-C por enzima trimérica (OLSEN, VETTING, RODERICK, 2008). O L β H adota a forma de um triângulo equilátero com 20Å de largura e 50Å de comprimento (Figura 5) (MOCHALKIN et al, 2007).

Figura 5: Estrutura da UNAcP da *Escherichia coli*. A esquerda vista paralela ao eixo molecular do domínio-C e a direita o L β H visto perpendicular ao eixo molecular 3D.



Fonte: Adaptado de MOCHALKIN et al, 2007

A região N-terminal pode ser dividida em dois lóbulos separados pelo bolsão do sítio ativo. Os primeiros cem resíduos, contendo a sequência consenso (Thr82-Thr137-Gly140-Asn169-Gly171-Glu195-Thr199), forma a zona de ligação do nucleotídeo, enquanto que a segunda zona é a responsável pelo reconhecimento da molécula de açúcar. (SULZENBACHER et al, 2001).

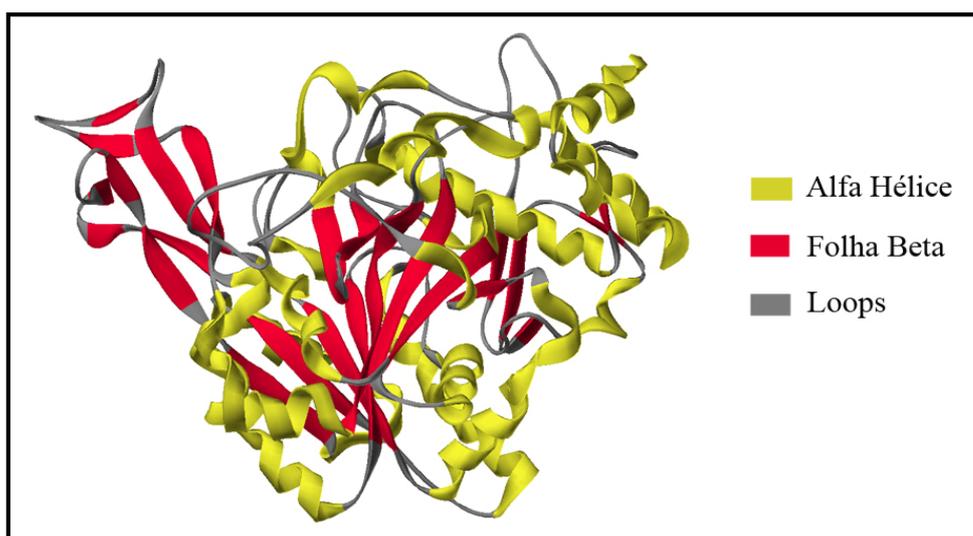
A presença do cofator altera a estrutura espacial da UNAcP, embora boa parte das folhas- β não sofram alterações, pode-se constatar que o primeiro lobo do domínio N-terminal aproxime-se mais dos substratos quando em presença do cofator, esta aproximação pode chegar a até 3Å. O íon Co^{2+} pode fazer interações com os fosfatos presentes na UDPNAc (distância de 2,3Å cada interação), os oxigênios da cadeia lateral da Asp105 (2,1Å) e Asn227 (2,2Å), e com duas moléculas de água; a geometria resultante imita uma esfera octahédrica geometricamente perfeita (Figura 3) (OLSEN, RODERICK, 2001).

As pirofosforilases de organismos eucariotos não realizam o processo de acetilação como visto nas enzimas de procariotos. Estruturalmente elas apresentam um domínio central na forma α - β - α , este enovelamento característico é denominado de Rossmann fold, e é constituído de oito folhas beta rodeadas por oito alfa hélices, e nas extremidades duas pequenas regiões de folha beta (Figura 6) (PENEFF et al, 2001). O Rossmann fold é um tipo de estrutura supersecundária de proteínas que foi elucidada por Michael Rossmann em 1973,

essa configuração espacial é tipicamente assumida por enzimas que tem nucleotídeos como substratos. (RAO, ROSSMANN, 1973; MURAMATSU et al, 2005).

Este pequeno domínio carboxi terminal extra é formado por 68 resíduos de aminoácidos. Em contraste com o domínio carboxi terminal, a região amino terminal é formada por segmentos semi-conservados na seqüência de aminoácidos (PENEFF et al, 2001, SANTOS JUNIOR et al, 2011). No entanto, mesmo sendo descontínuo esta região mostra certo grau de similaridade quando comparada com enzimas de bactérias e de outros organismos superiores. A seqüência semi-conservada inclui Leu-X₂-Gly-X-Gly-Thr-X-Met-X₄-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⁺², Co⁺² e Mn⁺² (OLSEN; RODERICK, 2001).

Figura 6: Modelo 3D da UNAcP do fungo *Moniliophthora perniciosa*

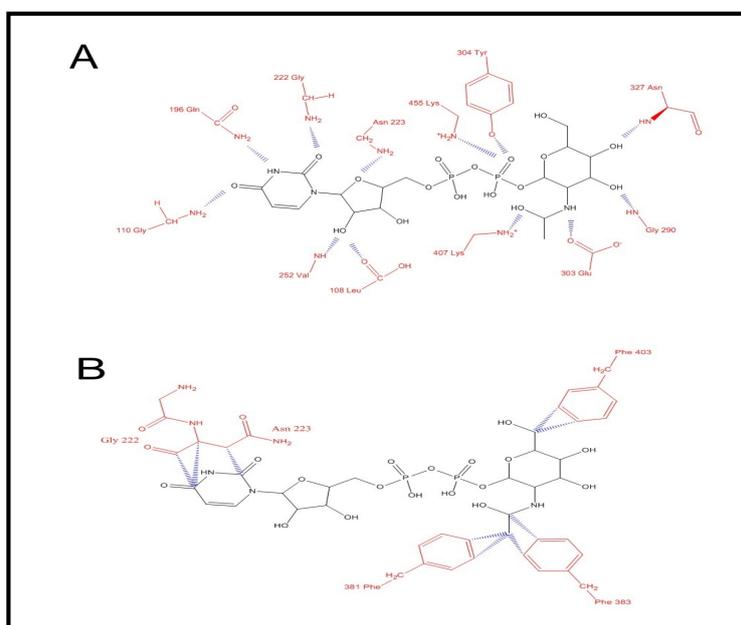


Fonte: SANTOS JUNIOR et al, 2011

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 o loop composto pelos resíduos Asp221-Leu226. O açúcar é estabilizado principalmente por ligações de hidrogênio formadas com os resíduos da segunda metade do loop central (resíduos 261-417) (PENEFF et al, 2001).

A conformação da acetilglicosamina também tem importância para seu reconhecimento pelo sítio ativo da enzima. O grupamento hidroxila, ligado ao C4, liga-se em conformação equatorial por meio de ligações de hidrogênio a Gly290 e Asn223. A porção N-acetil estabelece numerosas ligações de hidrogênio com os aminoácidos Glu303, His331 e Asn223, e uma interação hidrofóbica com Phe381 e Phe383. Estes contatos sugerem uma especificidade da enzima por hexosaminas acetiladas (Figura 6). Ao contrário do açúcar e do nucleotídeo, o grupamento fosfato é bem menos estabilizado (PENEFF et al, 2001).

Figura 7: Interações hidrofílicas (A) e hidrofóbicas (B) entre a acetilglicosamina e o sítio ativo da enzima pirofosforilase.



Fonte: RSCB, 2007.

A interações hidrofóbicas que ocorrem no sítio ativo de pirofosforilase derivam principalmente de uma bolsa hidrofóbica formada entre dois anéis benzênicos de resíduos de fenilalaninas localizadas nas posições 381 e 383. No entanto, o modelo construído por Santos Junior et al (2011) não apresenta esta bolsa hidrofóbica. Nas posições 381 e 383 encontraram-se uma glicina e uma leucina, respectivamente. Estas informações podem ser levadas em consideração para o desenvolvimento de novos inibidores mas específicos para a pirofosforilase fúngica. (SANTOS JUNIOR et al, 2011).

Quando se estuda a UNAcP de bactérias e outros microrganismos procaríotos, existe uma série de estruturas da enzima determinadas complexadas com os substratos naturais como também com o produto (Tabela 1) (BROWN et al, 1999; KOSTREWA et al, 2001;

OLSEN, RODERICK 2001; SULZENBACHER et al, 2001; MOCHALKIN et al, 2007). Atualmente existem 35 estruturas da enzima UNAcP depositadas no *Protein Data Bank* (PDB), sendo que cada uma destas mostra alguma particularidade, conforme descrito na Tabela 1. A resolução das proteínas variam de 1,75 a 3,41 Å, quando mais alta for a resolução dos dados, mais alto será a resolução do mapa de densidade eletrônica, que conseqüentemente, mostra uma melhor precisão da posição do átomos na estrutura (KLEYWEGT, JONES, 1997).

O R-factor, que refere-se a proximidade entre o fator de estrutura calculado e o fator observado, encontra-se dentro do limite aceitável (próximos ou menores que 0,2) para todos os modelos depositados no PDB. O ideal seria obter um valor igual a zero, no entanto, isso não é possível por uma série de razões. O principal motivo refere-se a propriedade das proteínas em possuir espaços que são preenchidos com moléculas de água, que por sua vez, não possui uma estrutura definida e também não está incluída no modelo atômico. Vibrações atômicas também podem contribuir para a variação no R-factor, pois as mesmas não são contabilizadas no modelo. (KLEYWEGT, JONES, 1997)

Somente a proteína 2V01 não apresentou um valor de R-free, em todas as outras o valor estava presente e dentro do limite aceitável, cerca de 0,26 acima do R-factor, sendo o ideal seria um valor igual ao R-factor. O R-free é uma forma de se retirar o viés que é introduzido com o R-factor, devido aos motivos apresentados anteriormente, assim o refinamento é realizado com 90% das observações experimentais, e o R-free é calculado para avaliar o quão bem o modelo prevê os 10% que não foram utilizados. (KLEYWEGT, JONES, 1997).

Tabela 1: Estruturas 3D, resolução, R-factor, R-free e origem da UNAcP depositadas no PDB.

PDB ID	Resolução (Å)	R-factor (%)	R-free (%)	Organismo de origem	Referência
1FWY	2,30	0,217	0,253	<i>Escherichia coli</i>	Brown et al, 1999
1FXJ	2,25	0,234	0,274	<i>Escherichia coli</i>	Brown et al, 1999
1G95	2,33	0,228	0,303	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Kostrewa et al, 2011
1G97	1,96	0,188	0,221	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Kostrewa et al, 2001
1HM0	2,30	0,211	0,244	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Sulzenbacher et al, 2001
1HM8	2,50	0,184	0,243	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Sulzenbacher et al, 2001
1HM9	1,75	0,183	0,219	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Sulzenbacher et al, 2001
1HV9	2,10	0,211	0,248	<i>Escherichia coli</i>	Olsen, Roderick, 2001
1JV1	1,90	0,183	0,220	<i>Homo sapiens</i>	Peneff et al, 2001
1JV3	2,20	0,190	0,234	<i>Homo sapiens</i>	Peneff et al, 2001
1JVD	2,40	0,193	0,251	<i>Homo sapiens</i>	Peneff et al, 2001
1JVG	2,30	0,201	0,240	<i>Homo sapiens</i>	Peneff et al, 2001
1VM8	2,50	0,210	0,266	<i>Mus musculus</i>	A Ser Publicado – RCSD, 2011c
2OI5	2,25	0,176	0,219	<i>Escherichia coli</i>	Olsen, Vetting, Roderick, 2007
2OI6	2,20	0,178	0,208	<i>Escherichia coli</i>	Olsen, Vetting, Roderick, 2007
2OI7	2,54	0,209	0,247	<i>Escherichia coli</i>	Olsen, Vetting, Roderick, 2007
2QKX	2,75	0,198	0,251	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Zhang et al, 2009
2V0H	1,79	0,192	0,214	<i>Haemophilus influenzae</i>	Mochalkin et al, 2007
2V0I	1,89	0,194	0,210	<i>Haemophilus influenzae</i>	Mochalkin et al, 2007
2V0J	2,00	0,199	0,223	<i>Haemophilus influenzae</i>	Mochalkin et al, 2007
2V0K	2,30	0,190	0,233	<i>Haemophilus influenzae</i>	Mochalkin et al, 2007
2V0L	2,20	0,187	---	<i>Haemophilus influenzae</i>	Mochalkin et al, 2007
2VD4	1,90	0,183	0,204	<i>Haemophilus influenzae</i>	Mochalkin et al, 2008
2WV0	1,99	0,200	0,232	<i>Haemophilus influenzae</i>	A Ser Publicado – RCSD, 2011d
2YQC	1,90	0,174	0,201	<i>Candida albicans</i>	Maruyama et al, 2007
2YQH	2,30	0,193	0,238	<i>Candida albicans</i>	Maruyama et al, 2007
2YQJ	2,31	0,193	0,237	<i>Candida albicans</i>	Maruyama et al, 2007
2YQS	2,30	0,183	0,223	<i>Candida albicans</i>	Maruyama et al, 2007
3D8V	2,55	0,201	0,244	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Zhang et al, 2009
3D98	2,50	0,199	0,244	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Zhang et al, 2009
3DJ4	2,38	0,197	0,257	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Parikh et al, 2009
3DK5	2,23	0,227	0,271	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Parikh et al, 2009
3FOQ	3,41	0,287	0,321	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Verma et al, 2009
3FWW	2,50	0,217	0,277	<i>Yersinia pestis pestoides</i>	A Ser Publicado – RCSD, 2011e

2.4 EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DA UDP-N-ACETILGLICOSAMINA PIROFOSFORILASE

A enzima UNAcP pode ser encontrada em uma variedade de organismos procariotos e eucariotos, e está envolvida na biossíntese de oligossacarídeos N- e O- dirigidos, glicilipídeos, peptideoglicanos e quitina, como referido anteriormente. Esta enzima foi parcialmente purificada de mamíferos e bactérias, purificada e parcialmente caracterizada de fungos e fígado de suínos (BULIK; LINDMARK; JARROLL, 1998; HEMMING, 1974).

Os primeiros estudos de purificação da pirofosforilase foram publicados no *Journal of Biological Chemistry*, em 1959, pelos pesquisadores Strominger e Smith, neste estudo, a enzima foi parcialmente purificada de fígado de bezerros e de cepas de *Staphylococcus aureus*. A acetilglicosamina-1-fosfato formada a partir de UDP-N-AcGlc foi hidrolizada a acetilglicosamina por prostática fosfomonoesterase. A acetilglicosamina livre foi determinada por um ensaio colorimétrico.

A UNAcP tem sido estudada especialmente em sistemas eucarióticos (BULIK *et al*, 2000). Esta enzima foi extraída e purificada de *Neurospora crassa* (YAMAMOTO *et al*, 1979), *Giardia intestinalis* (BULIK; LINDMARK; JARROLL, 1998), do fungo *Candida albicans* (MARUYAMA *et al*, 2006), fígado de bezerro e *Staphylococcus aureus* (STROMINGER; SMITH, 1959; ZENG *et al*, 1996); também foi purificada e caracterizada de hepatócitos de porco. No entanto, nenhum desses estudos de purificação resultou em uma enzima homogênea (SZUMILO *et al*, 1996).

Nos ensaios de purificação realizados por Yamamoto *et al* (1979), a UNAcP foi purificada 500 vezes para alcançar a homogeneidade da fração solúvel de extratos de fígado de porco. Ao final da purificação, a enzima era bastante estável e poderia ser mantida durante pelo menos quatro meses em baixas temperaturas com apenas ligeira perda de atividade (SZUMILO *et al*, 1996). Para os procedimentos de purificação, o ditiotreitol foi utilizado para proteger a enzima contra a inativação térmica (YAMAMOTO *et al*, 1979).

O resultado da purificação da enzima apresentou uma única banda protéica, e esta banda foi estimada a ter uma peso molecular de 125 kDa em Sephacryl S-300, e que provavelmente é um homodímero com duas subunidades de 64 kDa cada (SZUMILO *et al*, 1996). A UNAcP purificada manteve-se estável por aproximadamente seis meses à

temperatura de -20°C em solução tampão Tris-HCl 30 mM, pH 7,5, contendo 20% de glicerol e 0,1 mM de ditioneitol (BULIK, LINDMARK, JARROLL, 1998).

Em 1993, o gene da UNAcP pirofosforilase da *Escherichia coli* foi seqüenciado (MENGIN-LECREULX; HEIJENOORT, 1993) e em 1999 sua estrutura cristalina foi determinada através do mesmo procarioto (BROWN et al, 1999). Mio et al (1998) clonou, seqüenciou, e expressou a enzima de levedura e humanos e caracterizou parcialmente a cinética enzimática.

Peneff *et al* (2001) utilizaram a seqüência da pirofosforilase de astrócitos humanos para subclonar e expressar a enzima em células de *Escherichia coli*. A purificação da enzima foi realizada por meio de cromatografia de troca iônica, interação fenólica e exclusão de tamanho, dialisado contra Tris-HCl 10 mM pH 7,6 e ditioneitol 2,5 mM, por último a enzima foi concentrada para 6,6 mg/mL. Para este tipo de estudo os ensaios de atividade enzimática foram realizados a 30°C em um meio contendo Tris-HCl 100 mM pH 8,0, cloreto de magnésio (MgCl₂) 5 mM e cloreto de potássio (KCl) 20 mM.

O pH ótimo da UNAcP foi determinado no sentido inverso da reação, uma vez que a pirofosforilase catalisa a reação tanto no sentido de formar os produtos quanto da formação dos produtos para os reagente; Szumilo et al. (1996) realizou esta determinação tanto por ensaio radioativo quanto por um teste colorimétrico, os resultados encontrados ficaram muito próximos, 8.5 e 8.9, respectivamente. Já Strominger; Smith (1959) encontraram como pH ótimo o valor de 7,2 para a enzima extraída da bactéria *S. aureus* e fígado de bezerras; valor diferente também foi encontrado por Pattabiraman; Bachhawat (1961), no qual o pH ótimo foi de 8.0, sendo a enzima extraída de cérebro de ovelhas; Yamamoto et al. (1979) a máxima atividade enzimática foi observada em pH 7,5; Bulik; Lindmark; Jarroll (1998) encontraram a faixa de pH ótimo em torno de 7.5 a 8.0, para a pirofosforilase extraída de *Giardia intestinalis*.

Os estudos de Bulik e colaboradores mostraram que atividade máxima desta enzima está na faixa entre 37 a 42°C (BULIK; LINDMARK; JARROLL, 1998; YAMAMOTO *et al*, 1979). A enzima foi estável em uma faixa de pH 6,0-7,5 a 4°C (YAMAMOTO *et al*, 1979). A enzima tem ponto isoelétrico em torno de pH 4,4 (YAMAMOTO *et al*, 1979).

O peso molecular (PM) da enzima é variável de acordo com o organismo de origem da mesma; a pirofosforilase da *Giardia intestinalis* apresenta um PM igual a 66 kDa, o mesmo

valor é encontrado para a *G. lamblia*, 66 kDa (duas unidades de 33 kDa); a enzima extraída de fígado de porco apresentou um PM de 124 kDa, sendo duas subunidades de pesos diferentes (57 e 64 kDa); o peso molecular em leveduras e *Neurospora crassa* foi de 37 kDa, os menores valores encontrados (SZUMILO et al., 1996; BULIK LINDMARK; JARROLL, 1998; STROMINGER; SMITH, 1959; YAMAMOTO et al., 1976, PATTABIRAMAN, BACHHAWAT, 1960).

A enzima purificada armazenada a 4°C em tampão fosfato de potássio 0,1 M (pH 7,5) contendo ditioneitol 0,01 mM é estável por pelo menos duas semanas. A enzima sem ditioneitol não é estável, mas a perda de atividade durante o armazenamento pode ser recuperado pela adição de ditioneitol. O armazenamento da enzima a -20°C no mesmo tampão sem adição de ditioneitol, resulta em praticamente nenhuma perda de atividade por duas semanas (YAMAMOTO et al, 1979).

Estudos referentes à estabilidade térmica da UNAcP demonstram que a atividade enzimática residual, na presença de ditioneitol a 40°C foi de cerca de 80%. No entanto, a ausência de ditioneitol resultou na inativação da enzima pelo calor, sendo mantida apenas 50% da atividade a 40°C (YAMAMOTO et al, 1979).

A metodologia de purificação utilizada por SANTOS JUNIOR et al (2011) demonstrou a existência de quatro isoenzimas da UNAcP que diferem entre si no tamanho e nas suas características físico-químicas: PyroMp I, PyroMp II, PyroMp III e PyroMp IV.

As isoenzimas PyroMp I e PyroMp II possuem atividade máxima em faixas semelhantes, que compreendem pH 7,3-8,4 e temperatura ótima entre 51 e 68°C. Já as isoenzimas PyroMp III e PyroMp IV possuem maior atividade na faixa de pH de 6,9-7,7 e temperatura entre 28 a 37°C (SANTOS JUNIOR et al, 2011).

A enzima requer cátions divalentes para estimular a reação de pirofosforólise. Foi observado por Strominger e Smith (1959) que a concentração ótima para o Mg^{2+} era de 0,001 a 0,003M, e que houve inibição da enzima em altas concentrações deste cátion. Os cátions Mg^{2+} , Mn^{2+} e Co^{2+} mostraram-se eficazes em ordem decrescente. Já os demais foram ineficazes ou demonstraram atividade inibitória (YAMAMOTO et al, 1979). Dentre eles, o íon magnésio (Mg^{2+}) é o melhor cofator para a UDP-GlcNAc pirofosforilase na maioria dos organismos já estudados (Tabela 2) (BULIK; LINDMARK; JARROLL, 1998).

Tabela 2: Efeitos de cátions divalentes na atividade da enzima UDP-GlcNAc pirofosforilase de *Neurospora crassa*

Íon	Atividade relativa (%)
Nenhum	16
Mg ²⁺ (cloreto)	100
Mn ²⁺ (cloreto)	49
Co ²⁺ (cloreto)	38
Ni ²⁺ (sulfato)	19
Zn ²⁺ (sulfato)	12
Ca ²⁺ (cloreto)	9
Fe ²⁺ (sulfato)	3
Cu ²⁺ (sulfato)	0
Pb ²⁺ (acetato)	0

Fonte: YAMAMOTO *et al.*, 1979.

Na presença dos cátions Mn⁺², Mg⁺², Co⁺² e Ni⁺² a atividade enzimática foi ótima, já com os íons Zn⁺², Cu⁺² e Fe⁺² foi encontrada uma atividade razoavelmente satisfatória; outros íons como Fe⁺³, Ca⁺² e Hg⁺² não modificaram a atividade (OLSEN; RODERICK, 2001). O estudo de variação de concentração para os íons mais eficazes (Mn⁺², Co⁺² e Mg⁺²) indicou que a faixa ótima de atividade enzimática é conseguida quando estes íons estão no intervalo de concentração de 0,5 a 1,0 mM. Para todos os íons concentrações acima de 1mM resultam em queda da atividade. A pirofosforilase extraída de cérebro de ovelhas mostrou melhores resultados com o Mg⁺², seguido do Co⁺² e Mn⁺² (SZUMILO *et al.*, 1996).

2.5 CINÉTICA ENZIMÁTICA

A UNAcP extraída de *Giardia intestinalis* apresenta uma cinética enzimática típica de Michaelis-Menten, cujos valores de K_m e V_{max} foram, respectivamente, 2,25 mmol e 1,6 mg/proteína; vale destacar que quando tem-se como reagente a acetilglicosamina-1-fosfato a

reação não segue uma cinética de Michaelis-Menten, a cinética enzimática apresenta uma curva sigmoide, sugerindo ligação cooperativa do substrato com a enzima, comportamento este que indica que a enzima é homoalostérica. Outros valores encontrados para o K_m são 0,23 mmol, 6,1 mmol e 0,94 mmol para a pirofosforilase extraída de fígado de porco, leveduras e *S. aureus*, respectivamente, deve-se atentar que estes valores foram encontrados na reação reversa realizada pela enzima (BULIK, LINDMARK, JARROLL, 1998; SZUMILO et al, 1996; STROMINGER, SMITH, 1959; KAWAI et al, 1976).

Para a enzima extraída da *Giarda intestinalis*, o UMP inibe competitivamente a enzima para a formação da UDPNAcGlc ($K_i = 0,25\text{nM}$). Esta inibição parece ser reversível, pois a atividade da enzima foi restaurada depois de dialisada. UTP, UDP, ADP, AMP e uridina não afetam a atividade da enzima em concentrações acima de 5mM. UNAcP de leveduras e *N. crassa* são inibidas pela uridina no sentido da formação da pirofosforilase, sendo que a uridina foi um inibidor não competitivo com o UDPNAcGlc ($K_i = 1,8\text{mM}$ para leveduras e 1,1mM para *N. crassa*) (YAMAMOTO et al, 1980; SZUMILO et al, 1996, STROMINGER, SMITH, 1959).

No trabalho publicado por Santos Junior et al (2011), a pirofosforilase extraída do fungo *M. perniciosus* apresentou quatro isoformas, sendo que o valor de K_m encontrado foi de 3,54 mmol para a PyroMp I, 13,97 mmol para a PyroMp II, 4,22 mmol para a PyroMp III e 13,30 mmol para a PyroMp IV. O V_{max} exibiu valores que se encontram na faixa de 27,03 a 30,30 $\mu\text{mol min}^{-1}$. (SANTOS JUNIOR et al, 2011).

2.6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A enzima UNAcP mostrou uma importância crucial para a síntese da UDP-N-acetilglicosamina, no entanto, a atuação da enzima sobre a produção deste metabólito pode ser explorada em outros campos como na indústria farmacêutica, pois a UDP-N-acetilglicosamina faz parte de ciclos celulares de organismo como bactérias e fungos, a inibição da enzima pode implicar no controle de algumas infecções, podendo ajudar no desenvolvimento ou melhoramento de novos fármacos antifúngicos ou antibacterianos.

A UNAcP apresenta algumas diferenças quando compara-se organismos procariontes e eucariontes, estas diferenciações estão correlacionadas tanto a reação catalisada quanto a estrutura 3D assumida pela enzima. Em procariontes a reação ocorre em duas etapas

(acetilação e pirofosforólise) enquanto que em eucariontes ocorre somente a pirofosforólise. Estruturalmente a UNAcP apresenta como sítio característico o enovelamento do tipo L β H ou Rossmann fold, para procariontes e eucariontes, respectivamente.

A purificação e caracterização da enzima também apresenta muitas particularidades, foi possível observar que propriedades como massa molecular, condições de extração, K_m , K_i , estabilidade, temperatura e pH ótimo variam de acordo com o organismo na qual a enzima era extraída. Este fator é muito importante, pois a busca da inibição da pirofosforilase deve ter em mente a utilização da enzima, nos ensaios de inibição, do micro-organismo que se deseja controlar.

Os íons utilizados como cofatores da enzima são cruciais para a ocorrência da reação, no entanto, como pode ser visto, não somente a propriedade em ser divalente é importante para o processamento da reação, a natureza do íon também tem forte impacto nas características da enzima, em alguns casos podendo inclusive inibir a atividade enzimática.

Portanto o principal enfoque a ser dado sobre a enzima estudada é que suas características estão intimamente ligadas ao organismo em que a mesma se expressa, sendo assim, estudos ligados a pirofosforilase devem partir inicialmente da extração, purificação e caracterização da mesma, pois com estes dados é possível planejar melhor os estudos a serem realizados.

REFERÊNCIAS

- BROWN, K. et al. Crystal structure of the bifunctional N-acetylglucosamine 1-phosphate uridyltransferase from *Escherichia coli*: a paradigm for the related pyrophosphorylase superfamily. **The EMBO Journal**. v.18 n.15 p.4096–4107, 1999
- BULIK, D.A.; LINDMARK, D.G.; JARROLL, E.D. Purification and characterization of UDP-N-acetylglucosamine pyrophosphorylase from encysting *Giardia*. *Molecular and Biochemical Parasitology*. v. 95, n. 198, p. 135-139, 1998.
- 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.
- DEACON, J.W. Fungal Structure and ultrastructure. In: _____. **Fungal Biology**. Oxford. 4th ed. Blackwell Publishing Ltd. 2005, p. 48-66.
- DE LUCA, C. et al. Overexpression, one-step purification and characterization of UDP-glucose dehydrogenase and UDP-N-acetylglucosamine pyrophosphorylase. *Bioorganic e Medicinal Chemistry*. v. 4, n.1, p. 131-142, 1996.
- ENZYME, 2011. **ExpASY Bioinformatic Resource Portal**. Disponível em: <http://enzyme.expasy.org/cgi-bin/enzyme/enzyme-search-ec>. Acesso em: 12 set. 2011.
- EXPLORENZ, 2011. **The Enzyme Database: EC 2.7.7.23**. Disponível em: <http://www.enzyme-database.org/query.php?ec=2.7.7.23>. Acesso em: 12 set. 2011.
- GEHRING, A.M., LEES, W.J., MINDIOLA, D.J., WALSH, C.T., AND BROWN, E.D. Acetyltransfer precedes uridyltransfer in the formation of UDP-N-acetyl- glucosamine in separable active sites of the bifunctional GlmU protein of *Escherichia coli*. **Biochemistry**. n. 35, p. 579–585, 1996.
- KAWAI, H. et al. Purification of yeast UDP-N-acetylglucosamine pyrophosphorylase and its stabilization by dithiothreitol. **J. ferment. Technol.** n. 54, p. 463-5, 1976.
- KLEYWEGT, G. J. ; JONES, T. A. Model-building and refinement practice. **Methods in Enzymology**, n. 277, p. 208-230, 1997.
- KOSTREWA, D. et al. Crystal Structure of *Streptococcus pneumoniae* N-acetylglucosamine-1-phosphate Uridyltransferase, GlmU, in Apo Form at 2.33Å resolution and in complex with UDP-N-acetylglucosamine and Mg²⁺ at 1.96Å resolution. **J. Mol. Biol.** n.305, p. 279-289, 2001.
- HART, G. W. et al. Nucleoplasmics and cytoplasmic glycoproteins. John Willey & Sons, Ltd, Chichester, UK, 2007, 145 p.
- HEMMING, F. W. Biochemistry of Lipids (Goodwin, T. W., ed). University Park Press, Baltimore, 1974, p. 39–97.
- HESCOVICS, A.; ORLEAN, P. Glycoprotein biosynthesis in yeast. *The FASEB Journal*. v. 7, p. 540-550, 1993.

- MURAMATSU, H. A New Family of NAD(P)H-Dependent Oxidoreductases Distinct from Conventional Rossmann-Fold Proteins. **Journal of Bioscience and Bioengineering**. vol. 99, N. 6, p. 541–547, 2005.
- MARUYAMA, D. et al. Purification, crystallization and preliminary X-ray diffraction studies of UDP-N-acetylglucosamine pyrophosphorylase from *Candida albicans*. **Acta Cryst.** f. 62, p. 1206-1208, 2006.
- MARUYAMA, D. et al. Crystal structure of uridine-diphospho-N-acetylglucosamine pyrophosphorylase from *Candida albicans* and catalytic reaction mechanism. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 282, n. 23, p. 17221-17230, 2007.
- MIO, T. et al. The eukaryotic UDP-N-Acetylglucosamine pyrophosphorylases. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 273, n. 23, p. 14392-14397, 1998.
- MOCHALKIN, I. et al. Characterization of substrate binding and catalysis in the potential antibacterial target N-acetylglucosamine-1-phosphate uridyltransferase (GlmU). **Protein Sci.** v. 16, n. 12, p. 2657-66, 2007.
- MOCHALKIN, I. et al. Structure of a small-molecule inhibitor complexed with GlmU from *Haemophilus influenzae* reveals an allosteric binding site. **Protein Sci.** v. 17, n. 03, p. 577-82, 2008.
- OLSEN, L. R.; RODERICK, S. L. Structure of *Escherichia coli* GlmU pyrophosphorylase and acetyltransferase active sites. **Biochemistry**, n. 40, p. 1913-1921, 2001.
- OLSEN, L.R.; VETTING, M.W. RODERICK, S.L. Structure of the *E. coli* bifunctional GlmU acetyltransferase active site with substrates and products. **Protein Sci.** v. 16, n.6, p. 1230-5, 2007.
- PARIKH, A. et al. PknB-mediated phosphorylation of a novel substrate, N-acetylglucosamine-1-phosphate uridyltransferase, modulates its acetyltransferase activity. **J. Mol. Biol.** v. 386, n.2, p.451-64, 2009.
- PENEFF, C. et al. Crystal structures of two human pyrophosphorylase isoforms in complexes with UDPGlc(Gal)NAc: role of the alternatively spliced insert in the enzyme oligomeric assembly and active site architecture. **The European Molecular Biology Organization Journal**, v. 20, n. 22, p. 6191-6202, 2001.
- PIROVANI, C. P. ; OLIVEIRA, B. M. ; DIAS, C. V. ; SANTOS JUNIOR, M. C. ; HORACIO JUNIOR, B. T. ; SOUZA, C. S. ; UETANABARO, A. P. T. ; TARANTO, A. G. ; LOPES, M. A. . Knowledge Discovery in Genome Database: The chitin metabolic pathway in *Crinipellis perniciosa* (Stahel) Singer. In: Proceedings of the fourth brazilian symposium on mathematical and computational biology, 2005, Rio de Janeiro. Proceedings of the fourth brazilian symposium on mathematical and computational biology. Rio de Janeiro : e-papers, 2005. v. 1. p. 122-139.
- RAO, S. T.; ROSSMANN, M. Comparison of super-secondary structures in Proteins. **J. Mol. Biol.** N.76, p.241-256, 1973.
- ROGERS, K. **Bacteria and Viruses**. 1th ed. Britannica Educational Publishing, 2011, 205p.

- RCSD, 2000a. RSCB Protein Data Bank. **Disponível em:**
<http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=1JV1>. Acesso em: 25 abr 2007.
- RCSD, 2000b. RSCB Protein Data Bank. Disponível em:
<http://www.rcsb.org/pdb/ligand/ligandsummary.do?hetId=UD1&sid=1JV1>. Acesso: 22 abr 2007.
- RSCB, 2011c. **RSCB Protein Data Bank**. Disponível em:
<http://www.pdb.org/pdb/explore.do?structureId=1VM8>. Acesso: 19 set 2011
- RSCB, 2011d. **RSCB Protein Data Bank**. Disponível em:
<http://www.rcsb.org/pdb/explore.do?structureId=2w0v>. Acesso: 19 set 2011
- RSCB, 2011e. **RSCB Protein Data Bank**. Disponível em:
<http://www.rcsb.org/pdb/explore.do?structureId=3fww>. Acesso: 19 set 2011
- SANTOS JUNIOR, M. C.; GONÇALVES, P. A.; TARANTO, A. G.; KOBLITZ, M. G. B.; GÓES-NETO, A.; PIROVANI C. P.; CASCARDO, J. C. M.; CRUZ, S. H.; ZINGALI, R. B.; PEREIRA, G. A. G.; DIAS, C. V.; ASSIS, S. A. Purification, characterization and structural determination of UDP-N-Acetylglucosamine pyrophosphorylase produced by *Moniliophthora perniciosa*. *J. Braz. Chem. Soc.* v. 22, n. 6, p. 1015-1023, 2011.
- SILVERMAN, S. J., et al. Chitin synthase 2 is essential for septum formation and cell division in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* v. 85, p. 4735-4739.
- STROMINGER, J. L.; SMITH, M. S. Uridine diphosphoacetylglucosamine pyrophosphorylase. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 234, n. 7, p. 1822-1827, 1959.
- SNYDER, L.; CHAMPNESS, W. *Molecular genetics of bacteria*. American Society of Microbiology, Washington, DC, 2007
- SZUMILO, T. et al. Purification to homogeneity and properties of UDP-GlcNAc (GalNAc) Pyrophosphorylase. *The Journal of Biological Chemistry*. v. 271, n. 22, p. 13147-13154, 1996.
- SULZENBACHER, G. et al. Crystal structure of *Streptococcus pneumoniae* N-acetylglucosamine-1-phosphate uridyltransferase bound to acetyl-coenzyme A reveals a novel active site architecture. **J Biol Chem**. v. 276, n. 15, p. 11844-51, 2001.
- TELES, A. B. L. **Estudo do mecanismo catalítico da pirofosforilase do fungo *Moniliophthora perniciosa* por métodos QM/MM**. 2011, 64p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia). Departamento de Ciências Biológicas. Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Snatana, 2011
- YAMAMOTO, K. et al. Purification and characterization of yeast UDP-N-acetylglucosamine pyrophosphorylase. *Agric. Biol. Chem.* n. 40, p. 2275-81, 1976.
- YAMAMOTO, K. et al. Purification and some properties of uridine diphosphate N-acetylglucosamine pyrophosphorylase from *Neurospora crassa*. *Can. J. Microbiol.* n. 25, p. 1381-6, 1979.

YAMAMOTO, K. et al. Inhibition of UDP-N-acetylglucosamine pyrophosphorylase by uridine. *Biochimica et Biophysica*. n. 614, p. 367-372, 1980.

WANG-GILLAM, A. et al. A 17-Amino Acid Insert Changes UDP-N-Acetylhexosamine Pyrophosphorylase Specificity from UDP-GalNAc to UDP-GlcNAc. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 273, n. 42, p. 27055–27057, 1998.

VERMA, S. K. et al. Structure of N-acetylglucosamine-1-phosphate uridyltransferase (GlmU) from *Mycobacterium tuberculosis* in a cubic space group. **Acta Crystallogr.** n. 65(f), p. 435-439, 2009.

ZHANG, Z. et al. Structure and function of GlmU from *Mycobacterium tuberculosis*. **Acta Crystallogr.** n.65(Pt 3), p. 275-83, 2009.

CAPÍTULO 3

PURIFICATION, CHARACTERIZATION AND STRUCTURAL
DETERMINATION OF UDP-N-ACETYLGLUCOSAMINE
PYROPHOSPHORYLASE PRODUCED BY MONILIOPHTHORA
PERNICIOSA¹

¹ Artigo em anexo. Publicação na revista: **Journal of Brazilian Chemistry Society**, Vol. 22, No. 6, 1015-1023, 2011

Resumo

A enzima UDP-N-Acetilglicosamina pirofosforilase de *Moniliophthora perniciosa* (CCMB 0257), o fungo patogênico causador da doença vassoura-de-bruxa do *Theobroma cacao*, foi parcialmente purificada por precipitação com sulfato de amônio e cromatografia de gel filtração em Sephacryl S-200. O tampão de extração da enzima foi o fosfato de sódio, 0,050 mol L⁻¹, pH 7,0, contendo 1,0 mol L⁻¹ de NaCl. A metodologia de superfície de resposta (MSR) foi usada para a obtenção do pH e temperatura ótima. Os resultados mostraram quatro diferentes isoenzimas (PyroMp I, II PyroMp, PyroMp III e IV PyroMp) que apresentaram pH ótimo na faixa de 6,9-8,4 e temperatura ótima variando entre 28 a 68°C. A estrutura 3D de pirofosforilase do *M. perniciosa* foi obtida por modelagem comparativa. O modelo obtido mostrou uma boa qualidade, possuindo 78,6% de aminoácidos nas regiões energeticamente favoráveis. O modelo foi então submetido a simulações de Dinâmica Molecular (DM). O modelo apresentou uma boa qualidade geométrica após as simulações de DM (91,1% - gráfico de Ramachandran). A procura pelo sítio ativo da enzima mostrou que este é mantido extremamente conservado. Este modelo pode ser útil para desenvolvimento de novos inibidores contra a doença da vassoura-de-bruxa.

Palavras-chave: pirofosforilase, *Moniliophthora perniciosa*, caracterização cinética, purificação, isoenzimas, estabilidade térmica, estrutura 3D, modelagem comparativa

CAPÍTULO 4

ESTUDOS DE ANCORAGEM MOLECULAR NA ENZIMA UDP-
N-ACETILGLICOSAMINA PIROFOSFORILASE DO FUNGO *M.*
PERNICIOSA

4.1 INTRODUÇÃO

A maioria dos fármacos foram descobertos por metodologias de tentativa e erro, as quais consomem muito tempo e apresentam um gasto muito grande durante sua realização. No entanto, o desenvolvimento racional de fármacos surgiu como uma ferramenta mais eficaz e rápida para a descoberta de novos compostos bioativos, através da utilização de informações acerca dos receptores macromoleculares é possível se chegar mais rapidamente a um alvo terapêutico (KURTZ, 1992). A modelagem molecular pode auxiliar nesse processo como uma ferramenta muito importante, pois possibilita um maior entendimento de resultados biológicos (PARRY-SMITH, 1998).

A etapa inicial para o desenvolvimento racional de fármacos é a escolha do alvo molecular, a escolha desse alvo baseia-se não somente no problema que se deseja resolver, mas também envolve fatores econômicos e sociais (PATRICK, 2005). Em 1989 a economia da Bahia e outras regiões sofreu um forte impacto, a produção de cacau sofreu uma drástica redução, o que, em parte, pode ser explicado pelo surgimento e desenvolvimento do fungo *Moniliophthora perniciosa*, que é responsável por uma praga conhecida como vassoura-de-bruxa do cacau (PEREIRA et al., 1990). Esta enfermidade foi responsável por danos que compreendem efeitos econômicos e sociais, além do impacto agrônomo imediato. E devido a ela 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, 2002). Em 1980 a produção de cacau no Brasil era de 368 mil toneladas, em 2005 esse número caiu para 155 mil toneladas (CEPLAC, 2012).

Esforços foram utilizados para tentar conter a expansão da vassoura-de-bruxa na Bahia, no entanto, boa parte destes falharam devido a muitas razões, sendo a falta de resistência genética durante os primeiros contatos com a praga. A redução do avanço da praga tem sido feita utilizando medidas básicas e praticas de agricultura como podas fitossanitárias, fertilização ou aplicação de fungicidas cúpricos. O aumento de preços dos fungicidas aliado ao valor de aplicação (300kg/he) tem inviabilizado esta prática para a maioria dos agricultores (MEDEIROS et al, 2010). Esforços têm sido voltados para a busca de medidas alternativas para o controle efetivo da vassoura-de-bruxa, podendo ir desde a racionalização do uso dos fungicidas cúpricos (ainda muito caros) a redução da frequência de realizações do saneamento vegetal (COSTA et al, 2009; MEDEIROS et al, 2010).

Vários compostos químicos vêm sendo testados com o objetivo de prevenir ou erradicar a vassoura-de-bruxa, porém os resultados não têm sido satisfatórios (OLIVEIRA, LUZ, 2005). Inibidores da biossíntese da parede celular bacteriana, como as penicilinas e cefalosporinas, têm apresentado bons resultados no controle de infecções bacterianas. De forma similar, a parede celular dos fungos é um bom alvo para o desenvolvimento de potentes antifúngicos (GRIFFITH, TRACY, 2002). A UDP-N-acetilglicosamina é um precursor essencial para a síntese de quitina, principal componente da parede celular fúngica (HERSCOVICS; ORLEAN, 1993).

Na busca por um controle efetivo da vassoura-de-bruxa, escolheu-se a rota metabólica que leva a síntese da quitina. O alvo nessa via metabólica foi a enzima UDP-N-acetilglicosamina pirofosforilase (UNAcP) que é a responsável pela reação que forma UDP-N-acetilglicosamina. Desta forma, a inibição da formação de UDP-N-acetilglicosamina afetará a formação de quitina e assim a síntese da parede celular, um componente crucial para o desenvolvimento do fungo.

Seguindo as metodologias para o desenvolvimento racional de fármacos, os inibidores para a enzima pirofosforilase foram concebidos de acordo com as considerações e análises existentes na literatura acerca da forma com o UDP-N-acetilglicosamina e UTP ligam-se ao sítio ativo da enzima, neste sentido, o conhecimento da conformação espacial do sítio ativo da enzima (SANTOS JUNIOR, 2007) juntamente com os poucos ensaios de inibição realizados com a enzima (STROMINGER, 1959) foram fundamentais para o desenho dos novos antifúngicos.

A conformação do UTP no sítio ativo da UDPGlcNAc é similar em todas as enzimas. O UTP acopla-se na região central da enzima, estabelecendo contato com a primeira metade desta região (resíduos 68-260) e em particular com a alça formada pelos resíduos Asp221-Leu226. O açúcar é estabilizado principalmente por ligações de hidrogênios formadas com os resíduos da segunda metade do loop central (resíduos 261-417). A porção N-acetil estabelece numerosas ligações de hidrogênio com os aminoácidos Glu303, His331 e Asn223, e uma interação hidrofóbica com Phe381 e Phe383 (PENEFF et al, 2001). A pirofosforilase do fungo *M. perniciosa* possui um sítio ativo diferente das pirofosforilases que possuem estrutura 3D determinada, não há um bolsão hidrofóbico que está presente nas outras enzimas (SANTOS JUNIOR, 2007; SANTOS JUNIOR et al, 2011).

Portanto este trabalho objetivou realizar estudos de ancoragem molecular seguidos por simulações de dinâmica molecular da enzima UDP-N-acetilglicosamina pirofosforilase do

fungo *M. pernicioso*. Tendo como meta o desenvolvimento de novos inibidores da enzima pirofosforilase de modo que os mesmo possam ser utilizados para o manejo da praga causada por este fungo.

4.2 MATERIAIS E MÉTODOS

4.2.1 Seleção dos ligantes

A seleção dos ligantes foi realizado com base na conformação espacial do sítio ativo do modelo construído por Santos Junior (2007), juntamente com outras informações pertinentes (principais interações e orientação espacial) acerca do reconhecimento molecular da enzima por seus ligantes.

Os compostos que podem ser reconhecidos pela UNAcP foram usados como base para o desenvolvimento dos inibidores protótipos. Sendo assim, os substratos, produtos e inibidores foram o ponto de partida do estudo. Descartando os compostos com atividade inespecífica (íons e substâncias quelantes), o conjunto de dados ficou composto pelos substratos N-acetilglicosamina e uridina-5'-trifosfato [UTP], pelo produto UDP-N-acetilglicosamina (PENEFF et al, 2001; MARUYAMA et al, 2007) e pelo inibidor uridina (STROMINGER, SMITH, 1959).

O modelo construído para a UNAcP do fungo *M. Perniciosa* foi alinhado com a estrutura cristalográfica 1JV1 (1,9Å de resolução). A orientação da sobreposição foi feita com base no alinhamento dos sítios ativos, que se mostrou conservado (PENEFF et al., 2001; OLSEN; RODERICK, 2001; DE LUCA, 1996). Dentre as enzimas depositadas no *Protein Data Bank* (PDB), esta estrutura apresenta as seguintes vantagens sobre outras: a) maior similaridade com a sequência da UNAcP do *M. pernicioso*, b) melhor resolução, c) apresenta-se complexada com os dois substratos naturais (PENEFF et al, 2001; EUROPEAN BIOINFORMACTICS INSTITUTE, 2011).

Os compostos protótipos foram gerados levando em consideração a natureza química dos substratos da enzima e dos inibidores descritos na literatura, sendo portanto estes os critérios para a seleção dos novos ligantes. Como requisitos mínimos foram estabelecidos o grupamento nucleosídeo, importante para o encaixe no sítio ativo da enzima (YAMAMOTO et al, 1980; PENEFF et al, 2001) e uma porção contendo o grupamento acetilglicosamina, local onde ocorre a reação de transferência do grupamento fosfato (OLSEN; RODERICK, 2001), estes sítios mostram-se importantes para o reconhecimento molecular da enzima para com seus substratos. Estes compostos foram projetados em conjunto com o Prof. Dr. Ricardo José Alves, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), o qual apresenta uma larga

experiência na síntese de carboidratos. Finalmente, os orbitais HOMO e LUMO foram calculados pelo método AM1 (DEWAR et al, 1984).

4.2.2 Estudos de Ancoragem

O estudo de ancoragem foi realizado no programa Autodock Vina 1.0.2, que utiliza o algoritmo *Iterated Local Search Global Optimizer* para otimização global estocástica, com isso uma sucessão de passos com uma mutação e otimização local (pelo método Broyden-Fletcher-Goldfarb-Shanno [BFGS]) são conduzidas, sendo que cada passo obedece ao critério Metropolis (TROTT, OLSON 2010).

Para a construção da caixa de ancoragem (*grid box*) foram utilizadas as coordenadas dos substratos da enzima (N-acetilglicosamina-1-fosfato [NAcGlc1P] e UTP). Estas coordenadas foram obtidas a partir da sobreposição entre a proteína cristalográfica 1JV1 e o modelo construído por Santos Jr et al (2011). Após a sobreposição das duas proteínas, com base no alinhamento entre os sítios ativos, a estrutura da 1JV1 foi retirada e as coordenadas atômicas dos substratos da enzima permanecerem no sítio ativo do modelo construído.

O modelo utilizado possui dois substratos em seu sítio ativo, sendo assim, foram construídas três caixas de ancoragem, sendo uma envolvendo a acetilglicosamina-1-fosfato (SA1), outra no UTP (SA2), e por fim, uma que agrupasse tanto a acetilglicosamina-1-fosfato quanto o UTP (SA3). Esta construção foi necessária, pois o programa Autodock Vina trabalha apenas com um ligante por vez, e como os compostos propostos apresenta características que possam facilitar sua ligação em uma zona ou em outra, optou-se por testar as possibilidades existente.

A SA1 foi definida como um cubo com centro geométrico na acetilglicosamina-1-fosfato, possuindo dimensões de 10 x 10 x 10 Å, espaçamento de pontos de 1Å e coordenadas X, Y e Z de -53.716, -15.923 e 77.297, respectivamente. A SA2 foi definida como um cubo com centro geométrico no UTP, possuindo dimensões de 14 x 10 x 6 Å, espaçamento de pontos de 1Å e coordenadas X, Y e Z de -61.543, -20.034 e 77.297, respectivamente. A SA3 foi definida como um cubo com centro geométrico entre a acetilglicosamina-1-fosfato e o UTP, possuindo dimensões de 18 x 14 x 16 Å, espaçamento de pontos de 1Å e coordenadas X, Y e Z de -58.323, -18.926 e 79.633, respectivamente.

Os melhores resultados obtidos com as três caixas foram minimizados pelo programa SANDER, presente no pacote de programas AMBER 10. O protocolo iniciou-se com 500 ciclos com Steepest Descent (SD) e 500 ciclos de Gradiente Conjugado (GG), com modelo de solvente implícito (modelo generalizado de Born) cutoff igual a 14Å, restrição espacial aos átomos do ligante de 500kcal/mol (KERRIGAN, 2009). Esta otimização inicial tem por objetivo retirar as interações ruins devido ao empacotamento molecular e ajustar melhor a proteína ao ligante, uma vez que o ancoragem realizado pelo AutoDock Vina 1.0.1 considera a proteína com uma estrutura rígida. Por fim realizou-se uma minimização com 3000 ciclos (1500 SD e 1500 GG), empregando-se as mesmas especificações acima, sem restrição espacial.

Seguindo-se a etapa de minimização, os complexos foram analisados para posteriormente serem submetidos as simulações de Dinâmica Molecular (DM). Inicialmente foram realizadas simulações curtas (100ps) variando-se a temperatura a cada 100K até o sistema atingir uma temperatura final de 300K. Após a etapa de aquecimento os complexos foram submetidos a DM de 8ns, temperatura constante de 300K, modelo de solvente implícito (modelo generalizado de Born) e cutoff igual a 14Å. Os resultados foram analisados com base no gráfico de RMSD (*Root-Mean-Square Deviation*) por tempo de simulação. (WALKER, 2006)

Por meio do programa ptraj (presente no AMBER 10) separou-se a zona de equilíbrio do restante da trajetória, a utilização de toda a trajetória pode gerar resultados menos fidedignos (CALDWELL, 2006; CASE et al, 2008). O mesmo programa ptraj foi utilizado para calcular a estrutura média (EM). A EM foi subdividida em Complexo (_{comp}), Proteína (_{ptn}) e Ligante (_{lig}), todos foram submetidos a 3000 ciclos de otimização o valor da energia (E) resultante desta etapa foi empregada para determinar a energia de ligação por meio da seguinte fórmula: $\Delta G = E_{\text{comp}} - E_{\text{ptn}} - E_{\text{lig}}$. (WALKER, 2006).

O melhor resultado foi submetido ao banco de dados Zinc (IRWIN, SHOICHET, 2005) para se avaliar a disponibilidade e viabilidade econômica do composto, um dos grandes problemas para o controle da vassoura-de-bruxa é a obtenção de compostos que sejam economicamente viáveis para o controle da praga (OLIVEIRA, LUZ, 2005). Assim, a triagem no Zinc foi processada buscando-se compostos similares com o composto que apresentou melhor resultado na etapa anterior. O Simplified Molecular-Input Line-Entry System (Smile) da substância foi adicionado ao campo de busca do Zinc, posteriormente seleciona-se o grau de similaridade (90, 95 e 99%) e a base de dados utilizada (comercialmente disponíveis).

4.2.3 Triagem virtual

Outra metodologia utilizada para a busca de compostos que possam ser utilizados como inibidores da enzima pirofosforilase do *M. pernicioso* foi a construção de uma base de dados com compostos extraídos de plantas do semi-árido baiano, com uma triagem virtual, subsequente, votando-se para a seleção de compostos com melhor energia de afinidade.

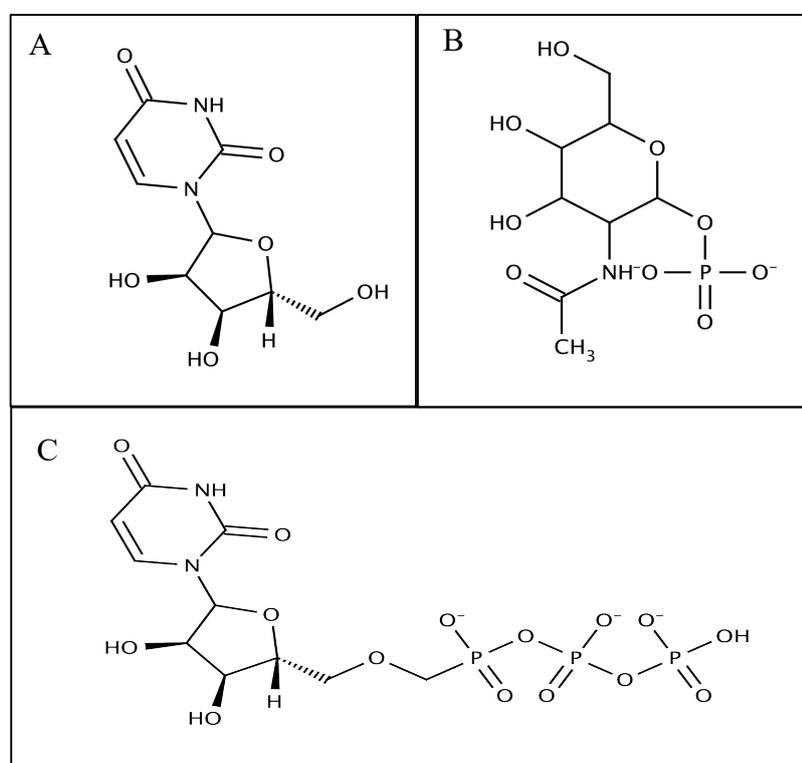
Após a revisão bibliográfica foram encontradas 459 moléculas, essas estruturas foram desenhadas e salvas no formato 2D (*.skc) e 3D (*.mol) através do software MarvinSketch 5.6.0.2. Em seguida foram otimizadas através de um método semi-empírico com o campo de força PM6 (STEWART, 2007) no software Gaussian 09W (FRISCH et al, 2009)

Para a triagem virtual foi utilizado o programa PyRx (WOLF, 2009) que utiliza o Autodock Vina para realização de triagem virtual. A caixa de ancoragem foi definida como um cubo com centro geométrico na região central do sítio ativo da enzima, possuindo dimensões de 18 x 14 x 16 Å, espaçamento de pontos de 1Å e coordenadas X, Y e Z de -58.323, -18.926 e 79.633, respectivamente.

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Três pontos principais foram determinados como importantes para o reconhecimento molecular do substrato pela enzima, alguns resíduos do nucleotídeo (uracil e a pentose) e a acetilglicosamina. Tais observações podem ser feitas, uma vez que, o inibidor relatado em literatura possui uma base nitrogenada e uma pentose, além disso, um dos substratos da enzima é o UTP e o outro é a acetilglicosamina-1-fosfato, tais observações podem ser vistas na Figura 1 (YAMAMOTO et al, 1980; PENEFF et al, 2001; STROMINGER, SMITH, 1959; SANTOS JUNIOR et al, 2009).

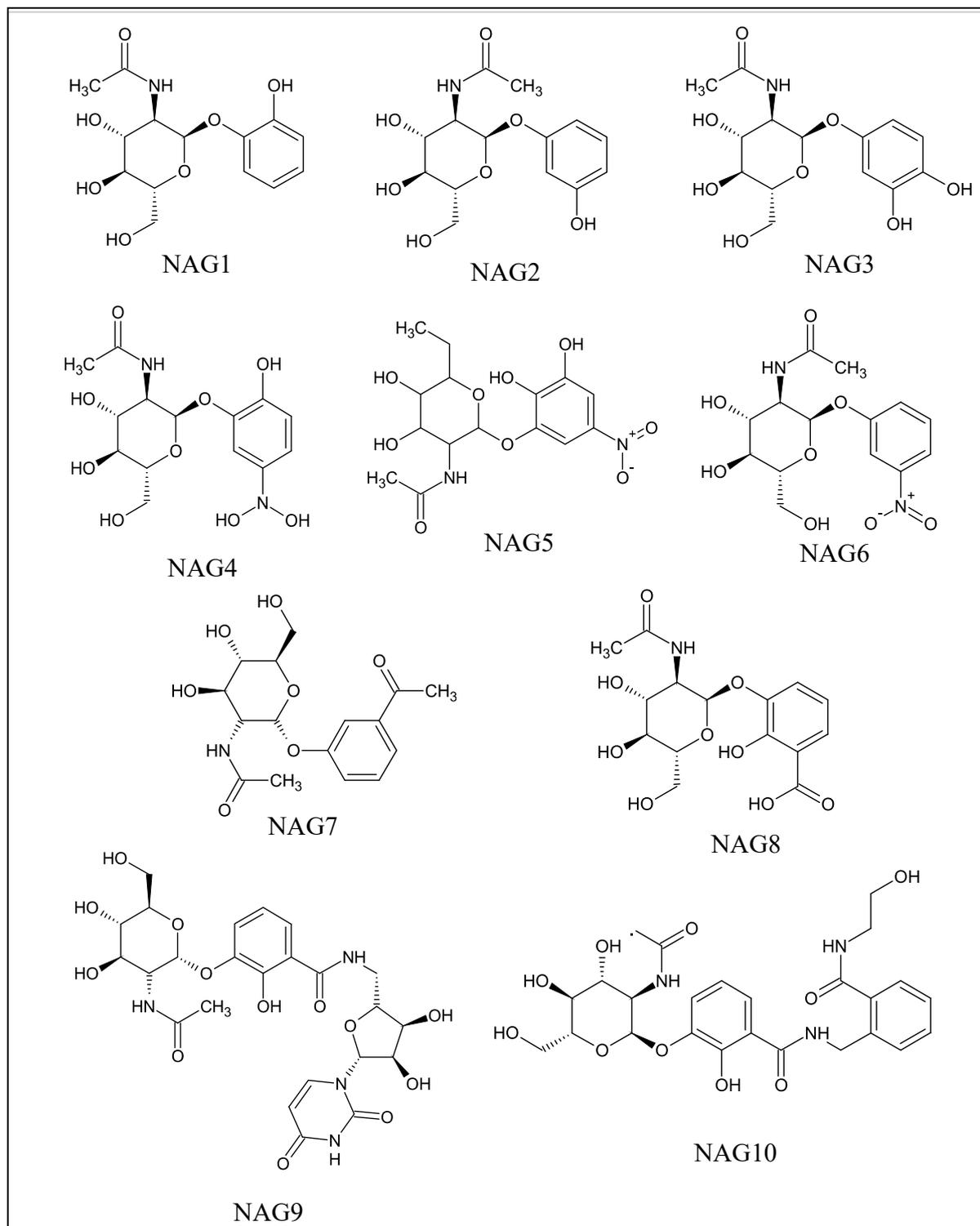
Figura 1: Estrutura da Uridina (A); Acetilglicosamina-1-fosfato (B); UTP (C).



Analisando-se o reconhecimento molecular, pode-se destacar que a pentose do nucleosídeos, estabelece ligações de hidrogênio com os resíduos da segunda metade do loop central da pirofosforilase, já a acetilglicosamina também é reconhecida por meio de ligações de hidrogênio, é possível observar também, uma interação hidrofóbica, na pirofosforilase de origem humana, essa interação ocorre entre duas fenilalaninas (PENEFF et al, 2001).

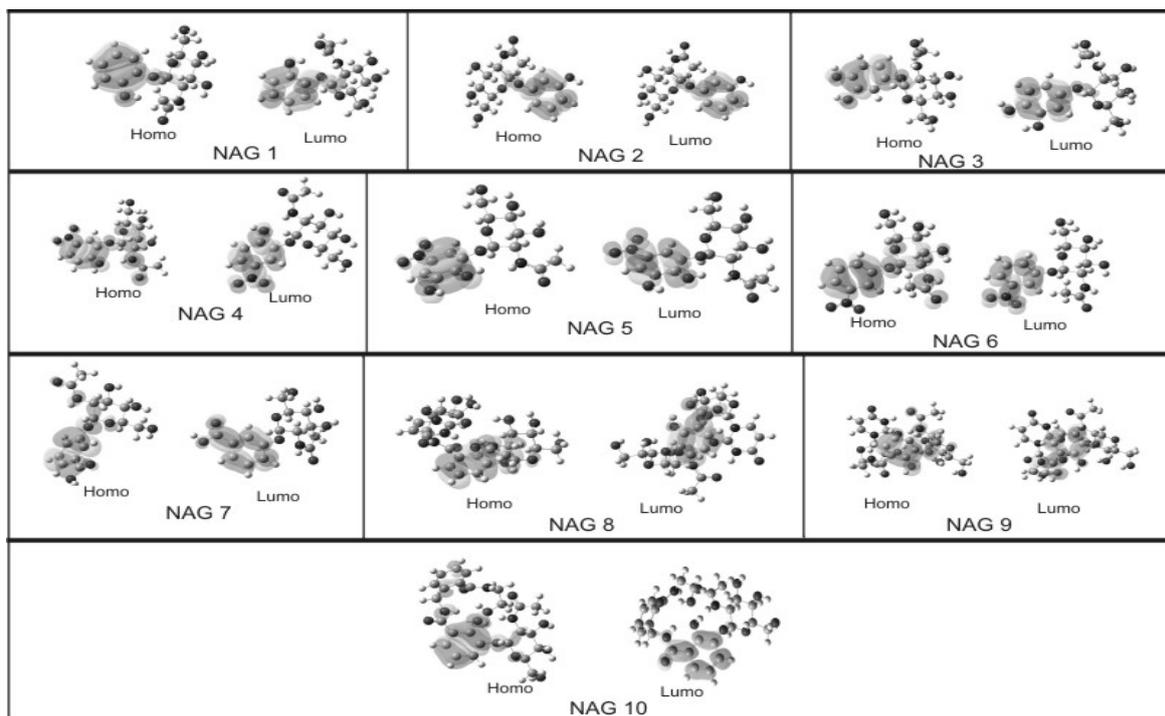
As informações sobre o sítio ativo da enzima são fundamentais para o desenvolvimento de ligantes (HARDY, SAFO, ABRAHAN, 1998), com base neste aspecto e nos dados acerca dos compostos que são molecularmente reconhecidos pela enzima foram propostos dez inibidores para a enzima UNAcP, como podem ser vistos na Figura 2.

Figura 2: Estrutura dos 10 inibidores protótipos e seus respectivos nomes.



A seguir, os orbitais de fronteira (*Highest Occupied Molecular Orbital* – HOMO e *Lowest Unoccupied Molecular Orbital* – LUMO) foram determinados. A figura 3 mostra posicionamento espacial de ambos os orbitais. Como pode ser observado, ambos se encontram sobre o grupamento fenólico em todos os protótipos.

Figura 3: Estruturas otimizadas pelo método AM1 com os correspondentes orbitais de fronteira HOMO e LUMO.



		Compostos	HOMO	LUMO	
A os resultados dos orbitais LUMO de inibidores,		NAG1	-194,53	87,85	Tabela 1 mostra para as energias HOMO e todos os incluindo a
		NAG2	-200,80	81,58	
		NAG3	-181,98	81,58	
		NAG4	-219,63	25,10	
		NAG5	-213,35	31,38	
		NAG6	-225,90	25,10	
		NAG7	-207,08	43,93	
		NAG8	-207,08	43,93	
		NAG9	-207,08	43,93	
		NAG10	-200,08	56,48	

acetilglicosamina-1-fosfato, o ligante natural da UDP-N-acetilglicosamina pirofosforilase. As energias estão muito próximas entre as moléculas. A faixa de energia varia de -229,67 Kcal/mol (NAG6) para -182,00 Kcal/mol (NAG3), e de 25,10 Kcal/mol (NAG6) para 87,85 Kcal/mol (NAG1), para os orbitais HOMO e LUMO, respectivamente. N-acetilglicosamina-1-fosfato possui um valor intermediário. Estes resultados sugerem que os ligantes propostos podem apresentar atividade biológica, uma vez que os orbitais de fronteira encontrados foram os mesmo determinados por Santos Junior (2007) para o substrato da enzima.

Tabela 1: Energia dos orbitais HOMO e LUMO dos inibidores propostos (kcal/mol).

Acetilglicosamina-1-fosfato	-213,35	25,10
-----------------------------	---------	-------

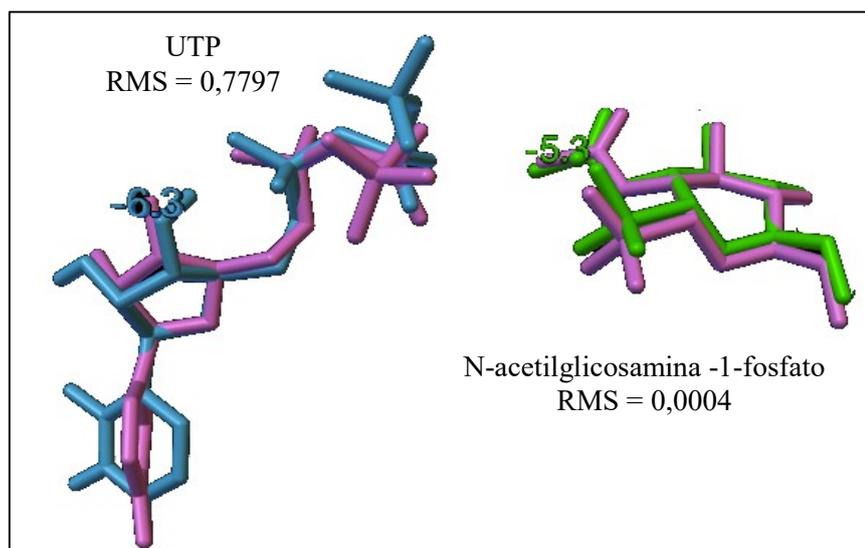
Os primeiros passos para os estudos de ancoragem envolvem uma análise detalhada do sítio de ligação e uma compilação de todos os aspectos envolvidos na afinidade e seletividade (SOTRIFER et al, 1998). Os seguintes resíduos são cruciais para a reação feita pela pirofosforilase: Leu108, Gly111, Gly112, Asp254, Glu304, Asn328, His331, Phe381, Phe383 e Lys408 (PENEFF, 2001). A porção osídica da UDP-N-acetilglicosamina estabelece numerosas ligações de hidrogênio com a Glu304, His331 e a Asn224, e também uma interação hidrofóbica com o Phe381 e Phe383 (PENEFF, 2001).

O sítio ativo encontrado no modelo MCSJ é muito conservado quando comparado ao da 1JV1, apenas as regiões compreendidas entre os resíduos 379-384 e 403-409 não apresentaram similaridade, destaque também para o bolsão hidrofóbico formado pelos resíduos Phe381 e Phe383, pois eles não existem no modelo construído (SANTOS JUNIOR, 2007; SANTOS JUNIOR et al, 2011).

Como relatado anteriormente, foram utilizadas três possíveis caixas de ancoragem, tendo duas como centro cada um dos substratos da enzima e uma terceira envolvendo os dois substratos. As conformações para o *re-dock* encontram-se na figura 4, como pode-se foram encontrados valores de RMS de 0,0004 Å e 0,7797 Å para a N-acetilglicosamina-1-fosfato e o UTP, respectivamente. Considera-se aceitável um valor de RMS abaixo de 2 Å (WONG, 2008, EWING et al, 2001, VIETH et al, 1998), portanto, os valores encontrados foram satisfatórios, indicando que as estruturas que foram ancoradas, apresentaram posicionamento espacial muito próximos das mesmas estruturas que foram utilizadas como referência, com isso, as caixas de ancoragem apresentam tamanho e localização satisfatórias. Para as estruturas ancoradas, N-acetilglicosamina-1-fosfato e UTP, as energia de afinidade foram -5,3 e -6,3 Kcal/mol, respectivamente.

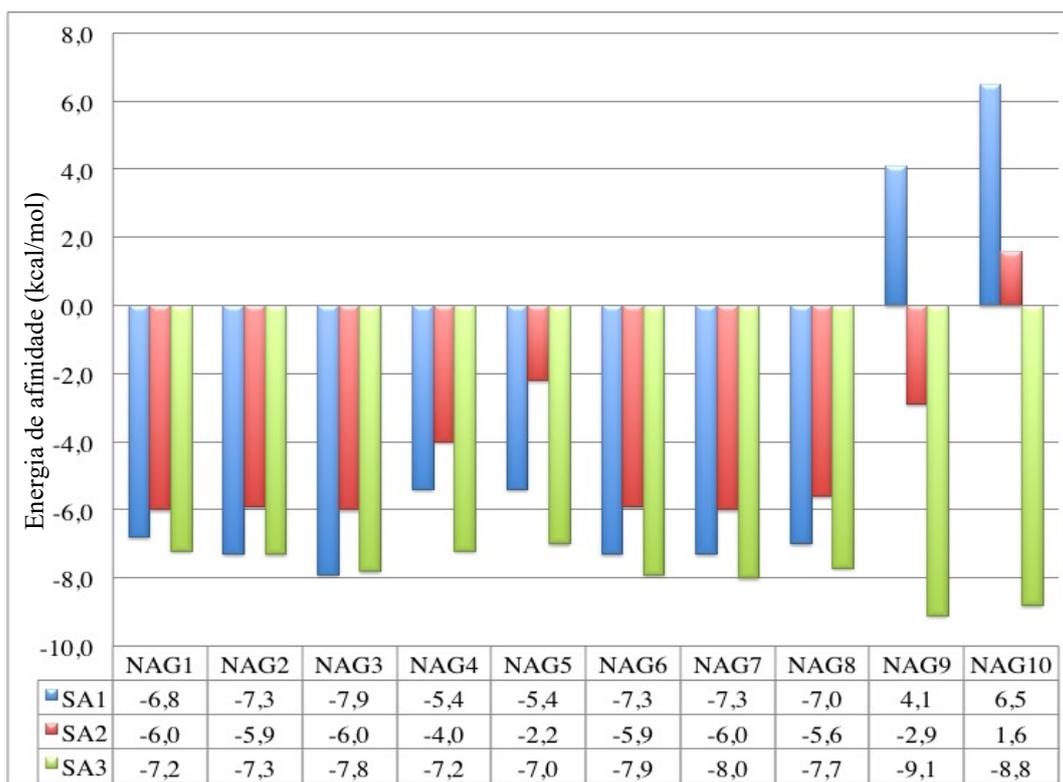
Figura 4: Redock das estruturas utilizadas como referência, juntamente com o valor de energia de afinidade e o RMS. Em rosa as estruturas de referencia, em azul o UTP e em verde a N-acetilglicosamina-1-fosfato. Imagem construída no programa AutoDockTools 1.5.6rcz2.

RMS calculado pelo programa MacPymol.



Na figura 5 estão descritos os resultados encontrados após a ancoragem de cada composto na enzima. Na caixa de ancoragem 1, o composto NAG3 apresentou melhor energia de afinidade (-7,9 kcal/mol), enquanto o NAG10 apresentou maior energia de afinidade (-6,5 kcal/mol), para a caixa 2, o composto de melhor afinidade foram os NAGs 1, 3 e 7, cujo valor de energia foi de -6,0 kcal/mol, nesta mesma caixa, o composto 10 apresentou maior energia de afinidade (1,6 kcal/mol). Por fim, na caixa 3 o composto de melhor afinidade foi o NAG9 (-9,1 kcal/mol), ficando o composto NAG5 com menor afinidade (-7,0 kcal/mol). Comparando-se as três caixa de ancoragem pode-se observar que a SA3 apresentou os melhores resultados (Figura 5), em 80% dos compostos o valor encontrado foi melhor para a SA3. Observa-se também que os compostos maiores (NAG9 e 10) apresentaram resultados poucos satisfatórios na SA1 e SA2, provavelmente ao tamanho a caixa, pois na SA3 os resultados foram melhores. Portanto a geometria obtida com essa SA3 foi utilizada para as simulações de DM.

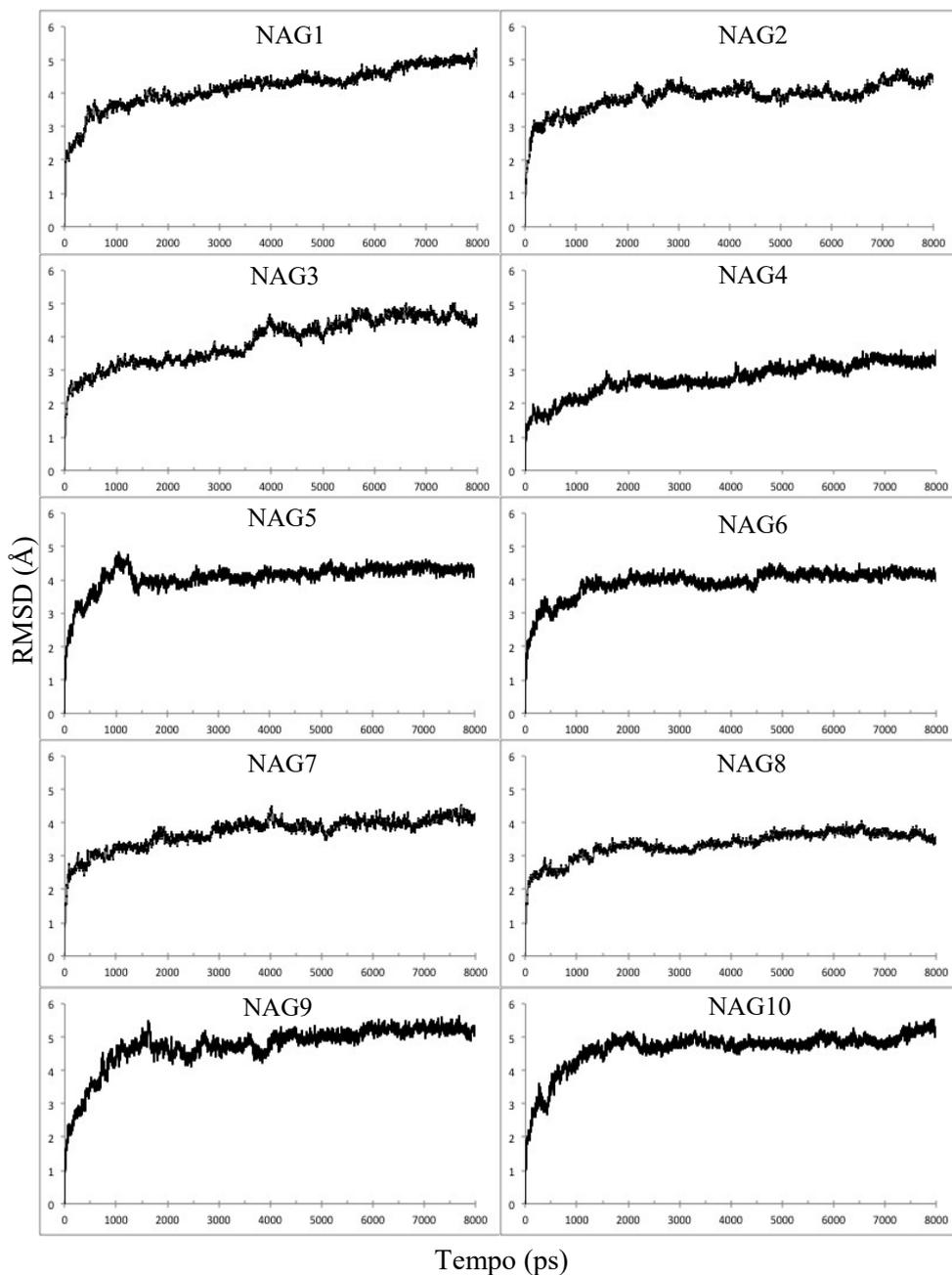
Figura 5: Valores de energia de afinidade para cada caixa de ancoragem.



Os dez ligantes foram submetidos a 8 ns de DM conforme especificado na metodologia. Os resultados da DM foram analisados de acordo com o tempo de simulação pela média do RMSD. A DM consiste em determinar explicitamente as trajetórias de pontos representativos do espaço através da solução numérica das equações de movimento. O objetivo básico deste método é observar a evolução do sistema através destas equações, devido as interações entre as partículas, o sistema é capaz de manter tanto o equilíbrio mecânico quanto térmico, e caso haja alguma perturbação externa, o sistema tende a atingir um novo equilíbrio (RINO; STUDART, 2001).

A Figura 6 mostra a variação do RMSD para os átomos de C α da proteína em função do tempo de simulação. O RMSD foi dependente de cada complexo, sendo que a menor variação foi encontrada para os complexos NAG4 (3,8Å) e NAG8 (3,8 Å), e a maior para o NAG9 (5,8Å) e NAG10 (5,8Å), as moléculas maiores apresentaram as maiores flutuações. Todas as simulações realizadas nos complexos atingiram o equilíbrio mecânico e térmico após 3ns de simulação, somente o complexo NAG3 levou um maior tempo para atingir o equilíbrio (4ns).

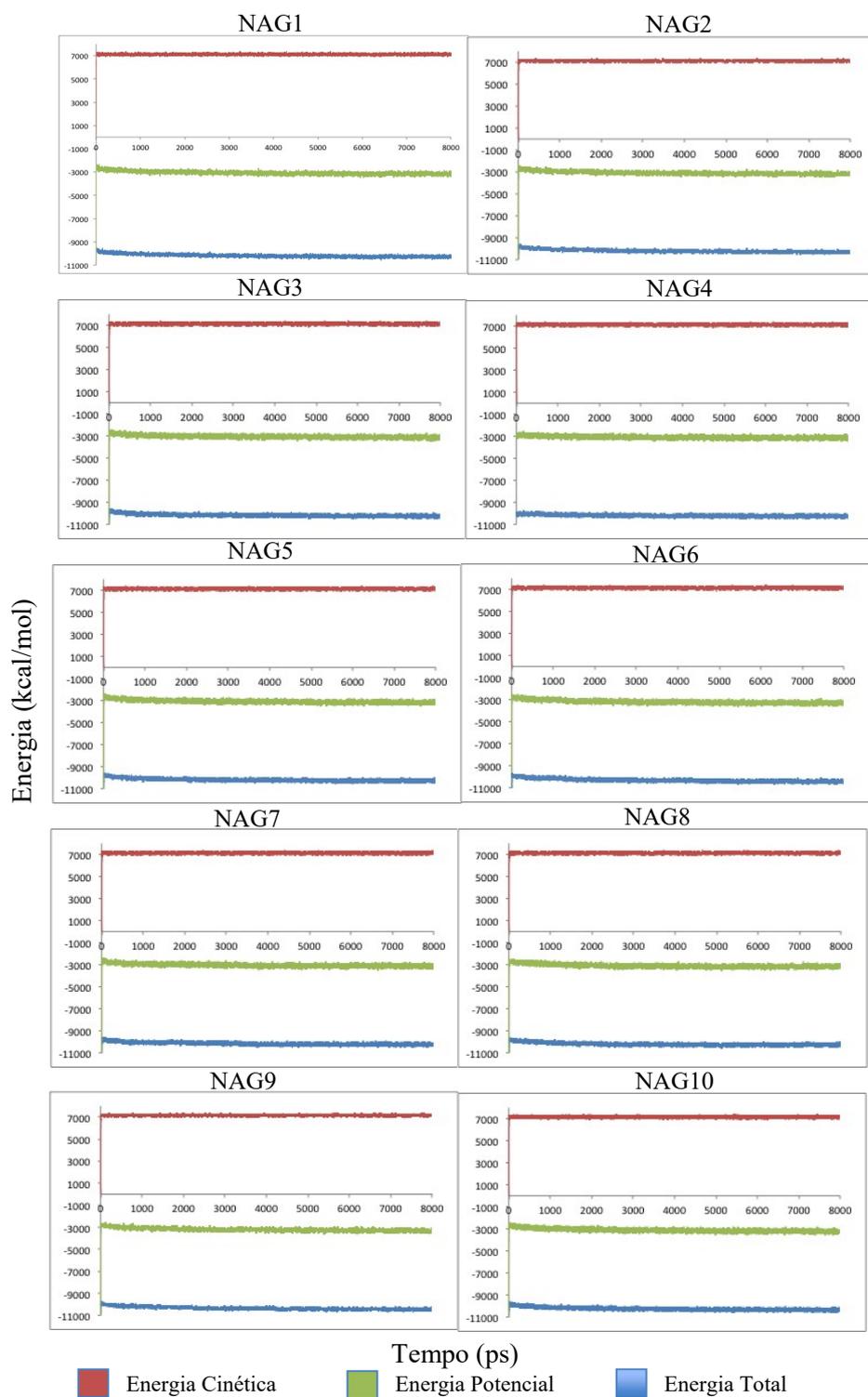
Figura 6: Gráfico de RMSD após a simulação de dinâmica molecular para cada complexo.



Para os valores de energia também foi obtido um equilíbrio ao fim das simulações (Figura 7), não havendo então flutuações significativas. O aumento da energia cinética no início da simulação refere-se a etapa de aquecimento do sistema, em seguida, observa-se que a energia cinética manteve-se constante durante toda a simulação, o que implica que a temperatura do sistema manteve-se constante no valor estipulado para o estudo. A energia potencial e, conseqüentemente, a energia total, mantiveram-se constante durante toda a trajetória, indicando um relaxamento do sistema e conseqüentemente um equilíbrio. Observa-se também que os valores de energia para todos os sistemas está muito próximo, afinal a proteína é a mesma, com diferença, apenas, dos ligantes, essas diferenças energéticas é que

foram exploradas para o cálculo da energia de ligação, para isso a estrutura média de cada complexo foi, então, utilizada para a determinação da energia de ligação.

Figura 7: Gráficos de energia após as simulações de dinâmica molecular para cada complexo.



inicialmente utilizado o programa ptraj, presente no pacote de programas Amber 10 que processa trajetórias e coordenadas de simulações. Em cada gráfico apresentado na Figura 6, foi realizado um corte na zona real de equilíbrio, pois, o equilíbrio só foi atingindo após um certo tempo de simulação, utilizando-se toda a trajetória os dados poderiam ser menos fidedignos. Após o corte, utilizou-se o ptraj para calcular a estrutura média de cada complexo.

Cada um dos dez complexos foram separados em NAG-Proteína, NAG e proteína, sendo que cada um destes foi otimizado por 3000 ciclos, sendo a energia final utilizada na fórmula, $\Delta G = E_{\text{comp}} - E_{\text{ptn}} - E_{\text{lig}}$, para determinação da energia de ligação (WALKER, 2006). Os valores encontrados estão na Tabela 2. O composto NAG5 apresentou melhor afinidade pela enzima pirofosforilase, o composto NAG2 apresentou um resultado muito próximo, diferindo em apenas 6,7 kcal/mol (Tabela 5). O composto NAG6 foi o que apresentou menor interação com a pirofosforilase, sendo 103,2 kcal mais energético que o composto de melhor afinidade (Tabela 2).

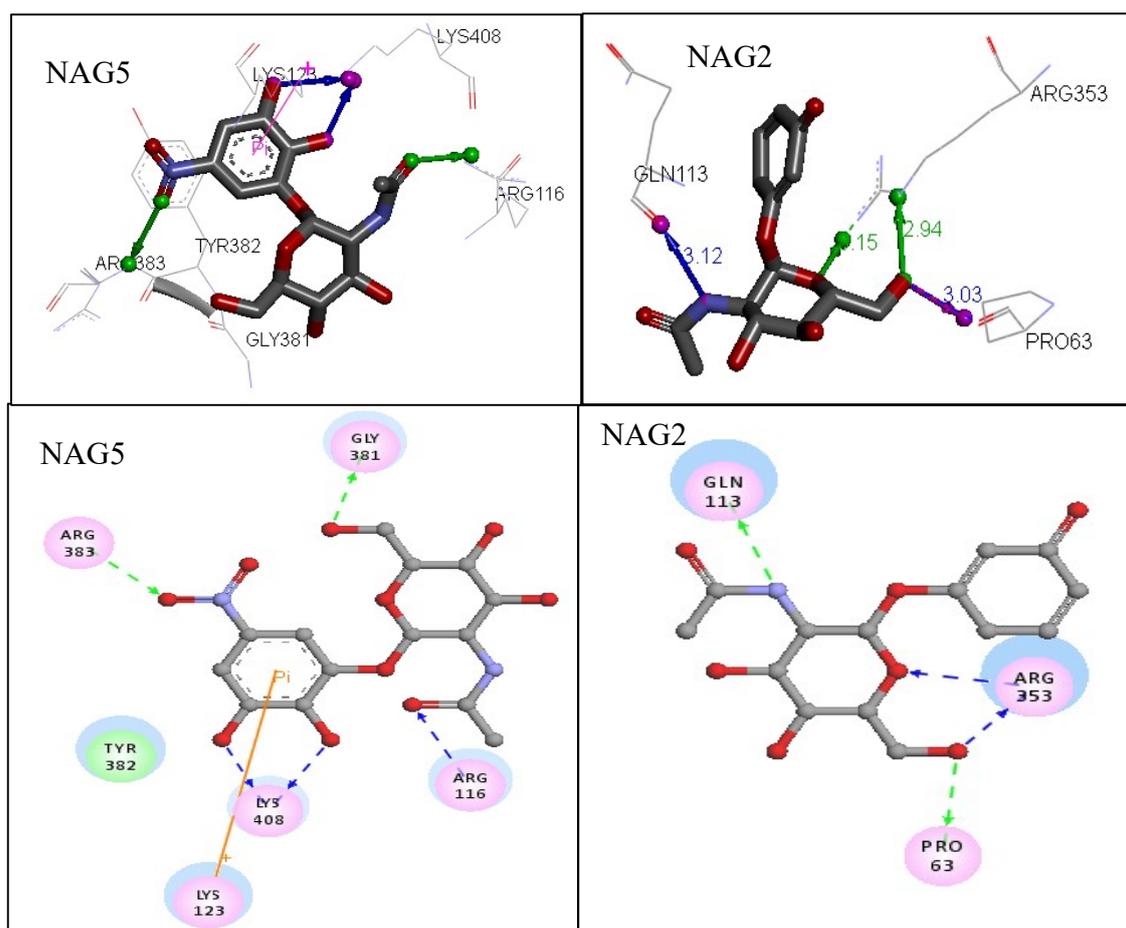
Tabela 2: Resultados encontrados para energia de ligação

Composto	Energias (kcal/mol)	
	Relativa	Ligação
NAG5	0,0	-95,2
NAG2	6,7	-88,2
NAG9	11,5	-83,7
NAG7	23,0	-72,2
NAG1	36,2	-59,0
NAG4	43,1	-52,1
NAG3	69,7	-25,5
NAG10	77,8	-22,4
NAG8	77,6	-17,6
NAG6	103,2	-8,0

O complexo formado entre a enzima/NAG5 apresentou muitas interações de hidrogênio, sendo encontradas ligações do tipo doador de hidrogênio (HBD) quanto acceptor de hidrogênio (HBA) (Figura 8). O NAG5 realiza uma interação do tipo HBA com o resíduo Arg116, a ligação de hidrogênio ocorre entre o grupamento amínico do aminoácido com o O1 do NAG5, a uma distância de 2,9 Å. O mesmo tipo de interação (HBA) ocorre com o resíduo

Arg383, no entanto, o grupo doador é o N1 do aminoácido e o receptor é o O9 do NAG5, a distância observada foi de 2,91 Å. Duas ligações HBD foram estabelecidas entre o N1 da Lis408 e os hidrogênios ligados aos O5 e O6 do NAG5 com distância de 3,01 e 3,09 Å, respectivamente. Outra interação do mesmo tipo foi estabelecida com o resíduo Gli381, sendo entre o O1 do aminoácido e o hidrogênio do O8 do ligante, com 3,14 Å.

Figura 8: Interações formadas entre os compostos NAG5 e NAG2 com a enzima pirofosforilase. Linha verde: HBA, Linha Azul: HBD, Linha Rosa: Interações hidrofóbicas. Visualização gerada pelo programa Discovery Studio 3.1.



Algumas poucas interações hidrofóbicas foram observadas no complexo formado. O anel aromático do NAG5 formou algumas interações hidrofóbicas com o anel aromático da Tir382, com distâncias de 3,85 Å (Figura 8). O anel aromático do NAG5 interagiu também com a amina da Lys123, por meio de uma interação π -cátion, com distância de 3,99 Å.

O complexo formado pelo NAG2, apresentou um padrão de ligação parecido com o NAG5, com diferença dos resíduos envolvidos. Dessa forma foi possível observar tanto ligações do tipo HBA quanto HBD (Figura 8). O O7 do NAG2 realiza dois tipos de interação diferentes com a pirofosforilase, é possível observar uma interação do tipo HBA com o O2 do resíduo Pro63 (3,03 Å), a outra interação que ocorre é do tipo HBD, no qual o hidrogênio ligado ao O7 do NAG2 interage com o nitrogênio do grupo amínico da Arg353, a distância da interação foi de 2,94 Å. O O3 do NAG2 realiza uma interação HBA com o nitrogênio do grupamento amínico da Arg353. O hidrogênio ligado ao N1 do NAG2 realiza uma interação do tipo HBD com o O1 da Gln113, com distância de 3,12 Å.

Ao contrário do NAG5, não foram observadas interações hidrofóbicas importantes entre o NAG2 e a enzima, talvez por isso exista uma pequena diferença energética (6,7 kcal/mol) entre a energia de ligação do complexo formado pelo NAG5, quando comparado ao NAG2 (Figura 8). A hidrofobicidade é um fator importante para o reconhecimento molecular, é reconhecido que algumas enzimas apresentam um bolsão hidrofóbico formado por duas fenilalaninas (PENEFF et al, 2001).

Observando os resultados encontrados percebe-se que a presença das interações de hidrogênio foram fundamentais para ligação dos compostos NAG5 e NAG2 ao sítio ativo da enzima pirofosforilase. No entanto, a orientação espacial do NAG5 se assemelha mais a que tem sido observada por outros autores acerca da ligação dos substratos no sítio ativo da enzima (PENEFF et al, 2001; MARUYAMA et al, 2007), na qual a enzima estabelece numerosas ligações de hidrogênio com hexosamina acetilada. Ainda é indicativo que os resíduos Arg116 e Lis123 são resíduos importantes para a reação catalítica realizada pela enzima pirofosforilase (SANTOS JUNIOR et al, 2011, MIO et al, 1998, PENEFF et al, 2001), interações com tais resíduos foram observados com o composto NAG5.

Como referido na metodologia o composto NAG5, assim como os demais, foram desenvolvidos ao nível teórico, portanto, o mesmo deve passar por um processo de síntese para ser utilizado na enzima pirofosforilase. No entanto, pode-se buscar outras fontes para o composto, devido ao interesse que o mesmo pode representar para o controle da vassoura-de-bruxa, uma vez que, o controle químico da praga ainda não tem mostrado resultados satisfatórios (OLIVEIRA, LUZ, 2005). Com base neste, aspecto foi realizada uma busca no

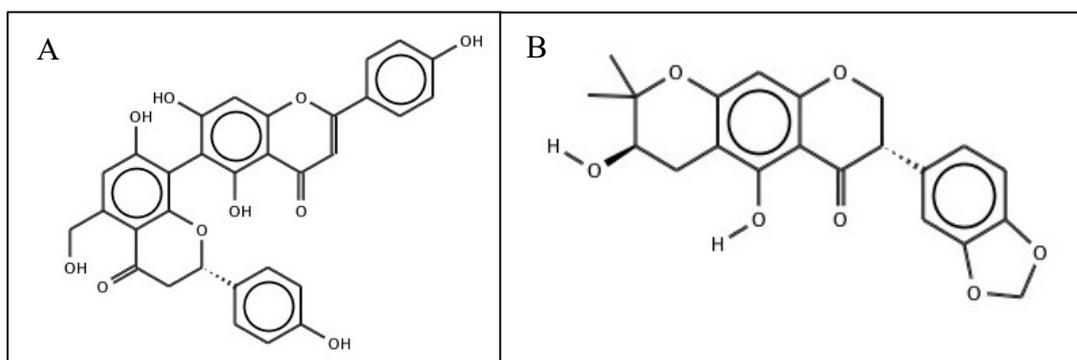
banco de dados Zinc (IRWIN, SHOICHET, 2005), por estruturas que possuíssem similaridade estrutural de 90-95% com o NAG5.

Após a busca no ZINC foram encontrados 33 compostos. Destes resultados o composto N-[4,5-dihidroxi-6-(hidroximetil)-2-(3-nitrofenoxi)oxan-3-il]acetamida, apresentou 95% de similaridade com o NAG5, no entanto, esse composto é um reagent analítico cujo valor de 200mg é de 60 dolares (MOLPORT, 2012), esse valor pode tornar o composto muito caro para ser empregado como antifúngico para o controle da vassoura-de-bruxa, no entanto, tais conclusões só poderão ser afirmadas com ensaios *in vitro* para a determinação da concentração inibitória.

Adicionalmente, tendo em vista da dificuldade em se encontrar um composto capaz de controlar a vassoura-de-bruxa, além de uma obtenção a custo reduzido para ser empregado na lavoura cacaeira, foi realizada uma busca em literatura de compostos químicos que foram extraídos de plantas do semi-árido baiano, essa base de dados foi construída e depositada em um programa desenvolvido pelo Laboratório de Modelagem Molecular e Laboratório de Computação de Alto Desempenho, da Universidade Estadual de Feira de Santana. Essa base de dados apresenta cerca de 459 estruturas. Realizou-se então, uma triage virtual desta base frente a enzima pirofosforilase, empregando-se o programa PyRx (WOLF, 2009), que faz uso do Autodock Vina 1.0.2 para realizar a ancoragem dos ligantes na enzima.

Os resultados, preliminares, apotam que os compostos UEFS24 (Agatisflavona) e UEFS35 (Harpacilina) (Figura 9), possuem energia de afinidade de -10,4 e -10,3 kcal/mol, respectivamente. Além destes, outros 15 compostos apresentaram energia de afinidade menor que -9,0 kcal/mol. As etapas seguintes deste trabalho, envolvem as simulações de DM molecular e os processos de obtenção dos compostos para testes *in vitro*, na enzima.

Figura 9: Estrutura dos compostos UEFS24 (A) e UEFS35 (B).



4.4 CONCLUSÕES

A busca por um controle efetivo da vassoura-de-bruxa tem demandado muitos esforços nesses últimos anos, principalmente ao impacto sócio-econômico que a praga vem causando no estado da Bahia e em outros sítios, anteriormente, produtores de cacau. O desenvolvimento deste trabalho tem como principal objetivo encontrar uma substância que possa servir para o controle efetivo da vassoura-de-bruxa, para isso, foram empregadas técnicas de planejamento racional de fármacos. Inicialmente o alvo molecular foi escolhido, a enzima pirofosforilase, e por fim foram selecionados dez ligantes que possam bloquear essa enzima, e com isso, impedir o desenvolvimento do fungo *M. perniciosus*, responsável pela vassoura-de-bruxa.

Assim, foram selecionados compostos com base nas estruturas que possam ser reconhecidas pela enzima pirofosforilase. Os mesmos foram submetidos a uma otimização e análise conformacional, sendo o melhor método escolhido o AM1, seguido por simulações de DM realizadas pelo programa Amber ou BioMedCache. Por fim, a ancoragem realizada pelo programa Audocok Vina com validação de DM, mostrou que o composto NAG5 apresenta energia de ligação satisfatória com a enzima pirofosforilase, o NAG2 também apresentou um grau de ligação satisfatório.

As próximas etapas para o controle da vassoura-de-bruxa serão, justamente, a obtenção do referido composto para seu teste, *in vitro*, com enzima pirofosforilase. O composto pode ser obtido, por meio de síntese, ou através de fontes comerciais, no entanto, neste último caso, seria utilizado um análogo estrutural, pois o composto NAG5 foi elaborado teoricamente. Resultados ainda preliminares indicam que alguns compostos extraídos de fontes naturais possuem afinidade pela enzima pirofosforilase, no entanto, estes resultados necessitam ainda de validações por estudos mais conclusivos.

REFERÊNCIAS

- CARDWELL, J. 2006. **Tutorial B5**. Using the *ptraj* program to analyze trajectories. Disponível em: <http://ambermd.org/tutorials/basic/tutorial5/>. Acesso em: 29 set. 2011.
- CASE, D.A., DARDEN, T.A. CHEATHAM, T.E., C.L. III, SIMMERLING, J. WANG, R.E. DUKE, R. LUO, R.C. WALKER, W. ZHANG, K.M. MERZ, B.P. ROBERTS, B. WANG, S. HAYIK, A. ROITBERG, G. SEABRA, I. KOLOSSVÁRY, K.F. WONG, F. PAESANI, J. VANICEK, J. LIU, X. WU, S.R. BROZELL, T. STEINBRECHER, H. GOHLKE, Q. CAI, X. YE, J. WANG, M.-J. HSIEH, G. CUI, D.R. ROE, D.H. MATHEWS, M.G. SEETIN, C. SAGUI, V. BABIN, T. LUCHKO, S. GUSAROV, A. KOVALENKO, AND P.A. KOLLMAN (2008), **AMBER 10**, University of California, San Francisco.
- CEPLAC. **Panorama da economia mundial de cacau**. Disponível em: http://www.ceplac.gov.br/Sinopse_Cacau/Panorama/producao-mundial.htm. Acesso em: 17 de jan. 2012.
- 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.
- COSTA, J.C.B. et al. Controle biológico da vassoura-de-bruxa do cacau da Bahia, Brasil. In: BETTIOL, W. Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas. Jaguariúna: Embrapa meio ambiente, 2009, p. 245-266.
- DEWAR, M. J. S. et al. AM1: a new general purpose quantum mechanical molecular model. **Journal of American Chemistry Society**. n. 107, p. 3902-3909, 1985.
- EUROPEAN BIOINFORMACTICS INSTITUTE, 2011. **Enzyme Structures Database**. Disponível em: http://www.ebi.ac.uk/thornton-srv/databases/cgi-bin/enzymes/GetPage.pl?ec_number=2.7.7.23. Acesso: 19 set 2011.
- EWING, T.J.A. et al. DOCK 4.0: search strategies for automated molecular docking of flexible molecule databases. **J. Compu-Aided Mol Des**. n. 15, p. 411-428, 2001.
- FRISCH, M. J.; TRUCKS, G. W.; SCHLEGEL, H. B.; SCUSERIA, G. E.; ROBB, M. A.; CHEESEMAN, J. R.; SCALMANI, G.; BARONE, V.; MENNUCCI, B.; PETERSSON, G. A.; NAKATSUJI, H.; CARICATO, M.; LI, X.; HRATCHIAN, H. P.; IZMAYLOV, A. F.; BLOINO, J.; ZHENG, G.; SONNENBERG, J. L.; HADA, M.; EHARA, M.; TOYOTA, K.; FUKUDA, R.; HASEGAWA, J.; ISHIDA, M.; NAKAJIMA, T.; HONDA, Y.; KITAO, O.; NAKAI, H.; VREVEN, T.; MONTGOMERY, JR., J. A.; PERALTA, J. E.; OGLIARO, F.; BEARPARK, M.; HEYD, J. J.; BROTHERS, E.; KUDIN, K. N.; STAROVEROV, V. N.; KOBAYASHI, R.; NORMAND, J.; RAGHAVACHARI, K.; RENDELL, A.; BURANT, J. C.; IYENGAR, S. S.; TOMASI, J.; COSSI, M.; REGA, N.; MILLAM, N. J.; KLENE, M.; KNOX, J. E.; CROSS, J. B.; BAKKEN, V.; ADAMO, C.; JARAMILLO, J.; GOMPERTS, R.; STRATMANN, R. E.; YAZYEV, O.; AUSTIN, A. J.; CAMMI, R.; POMELLI, C.; OCHTERSKI, J. W.; MARTIN, R. L.; MOROKUMA, K.; ZAKRZEWSKI, V. G.; VOTH, G. A.; SALVADOR, P.; DANNENBERG, J. J.; DAPPRICH, S.; DANIELS, A. D.; FARKAS,

- Ö.; FORESMAN, J. B.; ORTIZ, J. V.; CIOSLOWSKI, J.; FOX, D. J. **Gaussian**, Inc., Wallingford CT, 2009.
- FUJITSU. **BioMedCache 6.1**: User Guide. Oxford: Fujitsu Limited, 2003, 200 p
- GRIFFITH, G. W. et al. Autecology and evolution of the witch's broom pathogen (*Crinipellis perniciosa*) of cocoa. In: BLAKEMAN, J. P.; WILLIAMSON, B. *Ecology of Plant Pathogens*. Oxon: CAB International, 1994, p. 245-267.
- 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.
- 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.
- HARDY, L. W.; SAFO, M. K.; ABRAHAM, D. J. Structure-based drug design. In: ABRAHAM, D. J. (ed). **Burger's Medicinal Chemistry & Drug Discovery**. Wiley-Interscience, 1998, p. 417-470.
- HERSCOVICS, A.; ORLEAN, P. Glycoprotein biosynthesis in yeast. *FASEB Journal*, n. 7, p. 540-550, 1993.
- HERSCOVICS, A.; ORLEAN, P. Glycoprotein biosynthesis in yeast. **FASEB Journal**, n. 7, p. 540-550, 1993.
- IRWIN, J. J., SHOICHET B. K., ZINC – A Free Database of Commercially Available Compounds for Virtual Screening. *J. Chem. Inf. Model.*, 45 (1), p. 177–182, 2005.
- KERRIGAN, J. E. **Amber 9.0 drug/DNA complex tutorial**. Piscataway, New Jersey, 2009, 17p.
- KURTZ, I. D. Structure-based strategies for drug design and discovery. *Science*, v. 257, n.5073, p. 1078-1082, 1992.
- MARUYAMA, D. et al. Crystal structure of uridine-diphospho-N-acetylglucosamine pyrophosphorylase from *Candida albicans* and catalytic reaction mechanism. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 282, n. 23, p. 17221-17230, 2007.
- MEDEIROS, F.H.V. et al. A novel, integrated method for management of witches' broom disease in Cacao in Bahia, Brazil. *Crop. Protection*. n. 29, p.704-711, 2010.
- MOLPORT. **Molecule information**. Disponível em: <http://www.molport.com/buy-chemicals/moleculelink/N-4-5-dihydroxy-6-hydroxymethyl-2-3-nitrophenoxy-oxan-3-yl-acetamide/437184>. Acesso: 21 jan. 2012.
- MORRIS, G. M.; GOODSSELL, D. S.; HALLIDAY, R. S.; HUEY, R.; HART, W. E.; BELEW, R. K.; OLSON, A. J. Automated Docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function. *Journal of Computational Chemistry*, v. 19, n. 14, p. 1639-1662, 1998.

- OLIVEIRA, M.L.; LUZ, E.D.M.N. Vassoura-de-bruxa. In: _____. Identificação e manejo das principais doenças do cacaueteiro no Brasil. Ilhéus, CEPLAC/CEPEC/SEFIT, 2005, p. 15-33.
- PARRY-SMITH, D.J. Bioinformatics: its role in drug discovery. In: ABRAHAM, D. J. (ed). **Burger's Medicinal Chemistry & Drug Discovery**. Wiley-Interscience, 1998, p. 333-56.
- PATRICK, G. L. Drug discovery: finding a lead. In: _____. **An Introduction to Medicinal Chemistry**. Oxford. Oxford University Press, 2005, p.163-85.
- PEARLMAN, D. A. et al. Amber, a package of computer programs for applying molecular mechanics, normal mode analysis, molecular dynamics and free energy calculations to simulate the structural and energetic properties of molecules. **Computer Physics Communications**. n. 91, p. 1-41, 1995
- PENEFF, C. et al. Crystal structures of two human pyrophosphorylase isoforms in complexes with UDPGlc(Gal)NAc: role of the alternatively spliced insert in the enzyme oligomeric assembly and active site architecture. **The European Molecular Biology Organization Journal**, v. 20, n. 22, p. 6191-6202, 2001.
- PEREIRA, J. L. et al. First occurrence of witches' broom disease in the principal cocoa-growing region of Brazil. **Tropical Agriculture**, v. 67, n. 2, p. 188-189, 1990.
- RINO, J. P.; STUDART, N. Um potencial de interação para o estudo de materiais e simulações por dinâmica molecular. **Química Nova**, v. 24, n. 6, p. 838-845, 2001.
- SANTOS JUNIOR, M. C. **Determinação estrutural da enzima pirofosforilase do fungo *Moniliophthora perniciosa* (Sthael) (Singer) Phillips-Mora por modelagem comparativa**. 2007, 85p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia). Departamento de Ciências Biológicas. Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, 2007.
- SANTOS JUNIOR, M. C.; GONÇALVES, P. A.; TARANTO, A. G.; KOBLITZ, M. G. B.; GÓES-NETO, A.; PIROVANI C. P.; CASCARDO, J. C. M.; CRUZ, S. H.; ZINGALI, R. B.; PEREIRA, G. A. G.; DIAS, C. V.; ASSIS, S. A. Purification, characterization and structural determination of UDP-N-Acetylglucosamine pyrophosphorylase produced by *Moniliophthora perniciosa*. *J. Braz. Chem. Soc.* v. 22, n. 6, p. 1015-1023, 2011.
- 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.
- SOTRIFFER, C. et al. Docking and scoring functions. In: ABRAHAM, D. J. (ed). **Burger's Medicinal Chemistry & Drug Discovery**. Wiley-Interscience, 1998, p. 282-306.
- STROMINGER, J. L.; SMITH, M. S. Uridine diphosphoacetylglucosamine pyrophosphorylase. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 234, n. 7, p. 1822-1827, 1959.
- TROTT, O.; OLSON, A.J. AutoDock Vina: improvising the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization and multithreading. *Journal of Computational Chemistry*. n.31, p. 455-461, 2010.

VIETH, M. et al. Assessing search strategies for flexible docking. **J. Compt. Chem.** n. 19, p.1623-1631, 1998.

WALKER, R. 2006. **Tutorial 2, Section 3.** Using dynamics simulations to estimate binding energetics. Disponível em:
http://www.rosswalker.co.uk/tutorials/amber_workshop/Tutorial_two/section3.htm. Acesso em: 29 set. 2011.

WOLF, L. K. New software and Websites for the Chemical Enterprise. **Chemical & Engineering News**, v. **87**, n. 31, 2009.

WONG, C. F. Flexible ligand-flexible protein docking in protein kinases systems. **Biochimica et Biophysica Acta.** n. 1784, p. 244-251, 2008.

YAMAMOTO, K. et al. Inhibition of UDP-N-acetylglicosamine pyrophosphorylase by uridine. *Biochimica et Biophysica.* n. 614, p. 367-372, 1980.

CONCLUSÃO GERAL

O trabalho desenvolvido envolvendo a enzima pirofosforilase foi de suma importância, tanto para o conhecimento de funcionamento e caracterização da mesma, quanto para o desenvolvimento de metodologias mais efetivas para o controle da praga conhecida como vassoura-de-bruxa, causada pelo fungo *M. pernicioso*. Neste estudo foi possível estabelecer o melhor tampão de extração, fosfato de sódio, bem como as faixa de pH e temperatura ótimos, 6,9-8,4 e 28-68°C, respectivamente. Atualmente, a enzima extraída está sendo submetida a testes de inibição, estes ensaios estão hoje em curso, e os compostos serão avaliados *in loco*.

A estrutura 3D de pirofosforilase do *M. pernicioso* obtida por modelagem comparativa mostrou que o sítio ativo da enzima é mantido extremamente conservado. Este modelo foi utilizado para desenvolvimento de novos inibidores contra a praga da vassoura-de-bruxa. Observando as características dos substratos da enzima, dez compostos protótipos a inibidores foram selecionados. A metodologia de ancoragem pelo Autodock Vina, seguido de simulações de DM foram utilizados para avaliar a afinidade e grau de ligação de cada composto com a enzima.

O composto NAG5 apresentou melhores resultados com relação a energia de ligação a enzima pirofosforilase. Foi possível concluir que a enzima reconhece seus substratos principalmente por interações de hidrogênio e algumas poucas interações hidrofóbicas. A obtenção de compostos capazes de controlar a vassoura-de-bruxa, possui como grande entrave o custo do tratamento. Atualmente, o controle da praga envolve uma combinação de poda fitossanitária com controle químico. No entanto, muitos produtores relatam do custo do tratamento, que é bastante elevado. Portanto, não basta apenas encontrar um composto efetivo, mas é necessário que o mesmo possua um preço acessível, para que possa ser utilizado em larga escala na lavoura cacaueteira.

Neste sentido, foi iniciado um trabalho de construção de uma base de dados para depósito de estruturas que sejam extraídas de plantas do semi-árido baiano, que possam ser utilizadas em ensaios de triagem virtual para se avaliar a inibição da enzima pirofosforilase. Esta possibilidade pode abrir um novo caminho para o controle da praga vassoura-de-bruxa. Por fim, os compostos selecionados na triagem deverão seguir a mesma metodologia, selecionando os mais viáveis economicamente.

APÊNDICE A

CAPÍTULO 3

PURIFICATION, CHARACTERIZATION AND STRUCTURAL DETERMINATION OF UDP-N-ACETYLGLUCOSAMINE PYROPHOSPHORYLASE PRODUCED BY MONILIOPTHORA PERNICIOSA²³

² Artigo publicado na revista: J. Braz. Chem. Soc., Vol. 22, No. 6, 1015-1023, 2011

³ Resultados referentes a determinação estrutural são oriundos da dissertação de mestrado de Santos Jr, M. C. Determinação estrutural da enzima pirofosforilase do fungo *Moniliophthora perniciosa* (Sthael) (Singer) Phillips-mora por modelagem comparativa. Dissertação de mestrado. 83 p. 2007.