

## Estudos do Mecanismo de Catálise da Pirofosforilase UDP-*N*-acetilglucosamina do *Moniliophthora perniciosa* por Métodos QM/MM

André L. B. Teles<sup>a</sup>, Manoelito Coelho dos Santos Júnior<sup>a</sup>, Vanildo Martins Lima Braga<sup>b</sup>, Alex Gutterres Taranto<sup>\*b</sup>

<sup>a</sup>Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia UEFS/ FIOCRUZ-BA, Universidade Estadual de Feira de Santana – UEFS, Feira de Santana, Bahia, Brasil.

<sup>b</sup>Laboratório de Química Farmacêutica Medicinal, Programas de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas e Biotecnologia, Universidade Federal de São João del-Rei, Campus Centro Oeste, Divinópolis, Minas Gerais, Brasil.

Article history: Received: 09 October 2014; revised: 04 February 2015; accepted: 12 June 2015. Available online: 27 September 2015. DOI: <http://dx.doi.org/10.17807/orbital.v7i3.629>

**Abstract:** The fungus *Moniliophthora perniciosa* is the causal agent of the witches' broom disease of cacao (*Theobroma cacao*). This fungus has a pyrophosphorylase enzyme to catalyze the formation of UDP-*N*-acetylglucosamine-1-phosphate, an intermediate in the biosynthesis of the fungal cell wall. This enzyme was studied by QM/MM methods to understand its catalytic mechanism. Initially, the structure was refined and submitted to molecular dynamics simulations. Next, QM/MM calculations were used to scan the coordinates of the reaction from the reactants to products; an S<sub>N</sub>2 mechanism has been proposed of the aforementioned reaction. In this system, the nucleophile is the oxygen atom of the phosphate group from *N*-acetylglucosamine-1-phosphate. It attacks the phosphorus of the alfa-phosphate from the uridine triphosphate to form UDP-*N*-acetylglucosamine and pyrophosphate. The calculated reaction was exothermic ( $\Delta H = -81.01$  Kcal/mol). On the reaction pathway, the most energetic structure had the phosphorus atom attacked in a pentacoordinate configuration. This structure interacts with the catalytic site composed by the residues Gly112, Gly113, Arg116, Lys123 and Gly225 through hydrogen bonds. During the mechanism study, the geometry of the transition state was obtained. Thus, the generation of new compounds sharing a geometric similarity with this pentacoordinate transition state can lead to the development of more active compounds possessing antifungal properties against witch's broom.

**Keywords:** molecular dynamics; mechanism of action; molecular modeling; antifungal

### 1. INTRODUÇÃO

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. Esta é uma praga responsável por danos que compreendem efeitos econômicos e sociais, além do impacto agrônomico imediato. Tais alterações 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 [1, 2].

O controle químico da vassoura de bruxa foi inicialmente testado em 1909 no Suriname. Desde

então, novas tentativas foram feitas, inclusive no Brasil, sem que os resultados tivessem sido inteiramente satisfatórios. Os resultados salientaram que, em função da inadequação de medidas de controle, o controle químico ainda ofereceria, em curto prazo, as melhores opções de contenção da praga [3].

Atualmente, a necessidade de controle da praga se baseia no fato de se encontrar novos fungicidas que tenham alta seletividade, baixo custo de produção e de aplicação e apresentem baixa toxicidade aos mamíferos e outras formas de vida, que se fazem presentes no ecossistema onde a vassoura de bruxa é comum [4]. O desenvolvimento de novos antifúngicos depende das diferenças bioquímicas

\*Corresponding author. E-mail: [proftaranto@hotmail.com](mailto:proftaranto@hotmail.com)

entre os fungos e outros organismos [5]. Da mesma forma que inibidores da biosíntese da parede celular bacteriana, como as penicilinas e cefalosporinas, apresentam bons resultados no controle de infecções bacterianas, a parede celular dos fungos é um alvo potencial para o desenvolvimento de potentes antifúngicos [6].

Na busca por um controle efetivo da vassoura de bruxa, escolheu-se a rota metabólica que leva a síntese da quitina [7], o principal componente da parede celular fungicida [8,9]. O alvo escolhido nessa rota metabólica foi à enzima pirofosforilase, responsável em realizar a reação que forma UDP-*N*-acetilglicosamina, precursor essencial para a síntese de quitina. Desta forma, a inibição da formação de UDP-*N*-acetilglicosamina afetará a formação de quitina, e, por consequência, a síntese da parede celular, um componente crucial para o desenvolvimento do fungo [10].

O metabólito UDP-*N*-acetilglicosamina é formado pela atuação da enzima UDP-*N*-acetilglicosamina pirofosforilase sobre a acetilglicosamina-1-fosfato e uridina trifosfato (UTP). Nesta reação ocorre uma transferência de um grupamento fosfato do UTP para a *N*-acetilglicosamina com posterior liberação de fosfato inorgânico e uridina difosfato (UDP). O mecanismo de reação proposto sugere mecanismo de substituição nucleofílica bimolecular ( $S_N2$ ) [11].

A enzima pirofosforilase surge então como um alvo biológico potencial para o desenvolvimento de novos agentes antifúngicos, uma vez que sua inibição irá interferir na formação da parede celular dos fungos [8,9,12]. Tendo em vista que o estudo a nível molecular de sistemas biológicos representa importante ferramenta para o entendimento e manipulação da sua atividade, o estudo do mecanismo de catálise da pirofosforilase de *M. pernicioso* pode fornecer informações para o planejamento racional de inibidores. Grande parte dos compostos ativos é projetada com base em informações estruturais obtidas destes estudos teóricos [13].

O desenho de fármacos auxiliados por computador tem sido utilizado extensivamente [14]. Exemplos envolvem o uso da informação tridimensional de biomoléculas envolvendo técnicas como cristalografia de raios-X e Ressonância Magnética Nuclear (RMN). Isto é particularmente verdade quando é possível obter estruturas com alta resolução, cujo nível de detalhamento é maior [15]. O primeiro fármaco obtido empregando métodos

computacionais desenvolvido com base na estrutura do alvo molecular ocorreu em 1995, com a aprovação do inibidor de anidrase carbônica, dorzolamida (Trusopt®), utilizado como agente antiglaucoma desenvolvido pela Merck Sharp Dohme. Adicionalmente, outro exemplo de desenho racional de fármacos é o imatinib, um inibidor da tirosina kinase projetado para a função proteica *bcr-abl*, que é característica de leucemias Philadelphia cromossomo positivas (leucemia mielóide crônica e ocasionalmente leucemia mielóide aguda). O imatinib difere de fármacos previamente projetados para o câncer já que estes atingem células que rapidamente se dividem, não diferenciando células cancerígenas de células normais em outros tecidos [14].

Neste contexto, uma série promissora de antifúngicos foi sintetizada utilizando métodos computacionais baseado na estrutura do sítio ativo da enzima CYP450 14- $\alpha$ -esterol demetilase (CYP51) cuja estrutura cristalina é conhecida [16].

De forma similar, a UDP-*N*-acetilglicosamina pirofosforilase foi extraída do *M. pernicioso* por precipitação com sulfato de amônio e cromatografia de gel filtração. Como resultado, a sua atividade enzimática mostrou uma ótima ação com pH e temperatura variando entre 6,9 à 8,4 e 28 à 68 °C, respectivamente. Adicionalmente, o modelo desta foi criado por modelagem comparativa usando como moldes as estruturas cristalográficas sob os códigos *Protein Data Bank* (PDB) 1JV1 e 1VM8 com 47% e 46% de similaridade, respectivamente [12]. O modelo construído foi avaliado através do diagrama de Ramachandran e por simulação de dinâmica molecular, onde 91% dos aminoácidos encontraram-se em regiões energeticamente permitidas após a simulação. De posse deste modelo, seguiu-se para estudos de ancoragem molecular e desenhos de novos inibidores contra a UDP-*N*-acetilglicosamina pirofosforilase. Neste estudo, os autores mostraram que a interação ligante receptor ocorre através de ligação hidrogênio com Arg116, Arg383, Gly381 e Lys123; e interações hidrofóbicas com Tyr383 e Lys123 [10].

Dessa forma, o presente trabalho realizou um estudo do mecanismo catalítico da pirofosforilase de *M. pernicioso* através de cálculos híbridos quantum mecânico e molecular mecânico (QM/MM) [17, 18] considerando o mecanismo via  $S_N2$  [11,19,20]. Assim, serão fornecidas informações para auxiliar no desenvolvimento de novas alternativas ao controle da vassoura-de-bruxa do cacauero através da inibição

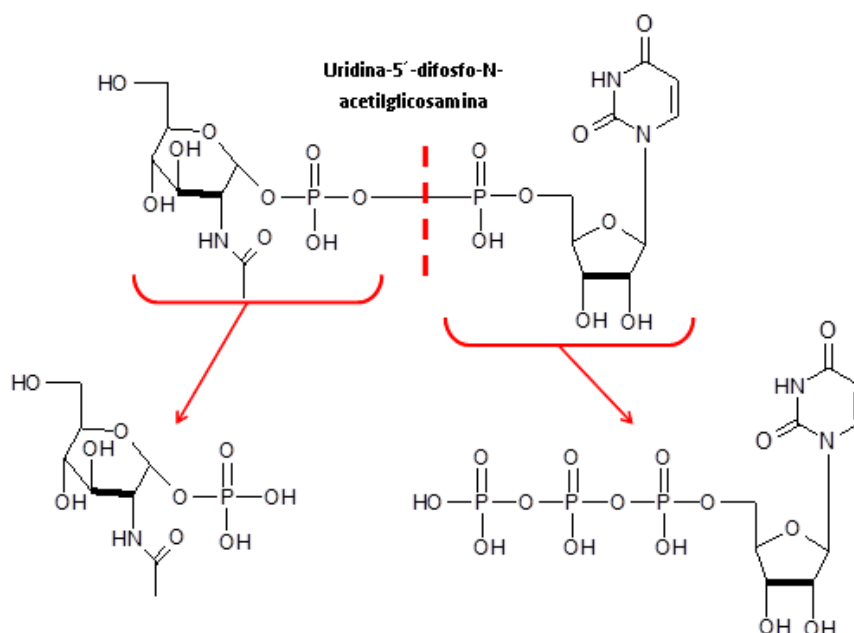
desta enzima. Estes resultados podem contribuir para o desenvolvimento de compostos mais ativos.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

Neste estudo, o complexo enzima-substrato do *M. pernicioso* foi preparado e submetido a simulações de dinâmica molecular para refinar a estrutura, aperfeiçoar a geometria e remover o choque entre os átomos devido ao efeito de empacotamento cristalino. Este processo é aplicado para devido ao processo de construção do modelo gerar conformações que não correspondem a estruturas próximas de um mínimo de

energia [21, 22]. Posteriormente, o sistema foi utilizado para os estudos de mecanismos catalíticos pelo método QM/MM.

De posse da estrutura tridimensional da pirofosforilase de *M. pernicioso*, previamente determinada por modelagem comparativa [21], foi realizada uma alteração na estrutura do produto UDP-*N*-acetilglicosamina para formar os substratos *N*-acetilglicosamina-1-P e UTP (Fig. 1). Um átomo de magnésio, cátion divalente, foi adicionado próximo aos grupos fosfatos da molécula de UTP de acordo com a orientação descrita previamente (Fig. 2) [11].



**Figura 1.** Esquema mostrando o local de alteração no UDP-*N*-acetilglicosamina para o desenho das estruturas da *N*-acetilglicosamina-1-fosfato (a) e UTP (b) no interior do sítio catalítico da pirofosforilase.

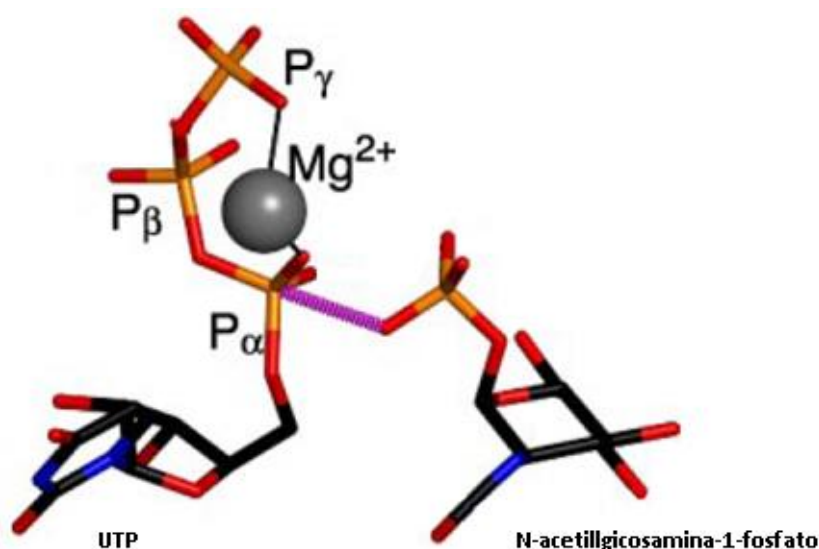
O complexo pirofosforilase-substrato de *M. pernicioso* foi submetido ao processo de refinamento de geometria através do pacote AMBER 09 [23], compostos pelos programas *LeaP* e *sander*. Inicialmente, as cargas dos resíduos da estrutura, considerando pH 7, foram ajustadas através do programa *LEaP* [23]. A seguir, a estrutura resultante foi submetida a um processo de refinamento de geometria para eliminar choques e interações indesejadas entre átomos. Esse processo é comumente empregado devido ao choque estérico formado durante a produção de estruturas modelos devido ao efeito de empacotamento cristalino. Para a refinamento foram empregados 1.500 ciclos, sendo 1.000 ciclos pelo *steepest descent* seguidos por 500 ciclos em gradiente conjugado empregando o

programa *sander* [23]. O complexo refinado foi submetido a simulações de dinâmica molecular (DM) para seu explorar de forma mais adequada à superfície de energia potencial. Inicialmente, uma dinâmica molecular de aquecimento com duração de 100 picossegundos (ps) e temperatura ascendente de 0 a 300 Kelvin foi aplicada. Por fim, seguiu-se com uma segunda dinâmica, denominada de dinâmica de produção, com duração de 1 nanossegundo. Os cálculos de refinamento e dinâmica molecular foram realizados sob uma distância para interação de átomos não ligados de 14 Å, e sob nenhuma restrição de pressão, temperatura ou geométrica (algoritmo SHAKE desativado) e com tempo de integração de 1 femtosegundo. Todos os cálculos utilizaram modelo de solvatação implícita (*generalized Born model*) [19].

Os campos de força ff03 [24] e *General Amber Force Field* (GAFF) [25], para a proteína e ligante, respectivamente, foram empregados em todos os cálculos.

A estrutura de equilíbrio do complexo pirofosforilase-substrato de *M. perniciosus* resultante da dinâmica molecular foi novamente refinada por 500 ciclos com gradiente conjugado conforme descrito acima. Esta estrutura refinada, após simulações de DM, foi utilizada para o estudo do mecanismo de catálise enzimática através de cálculos QM/MM [17, 26, 27]. Devido ao elevado custo computacional requerido para simular todos os átomos do sistema, optou-se por usar somente os

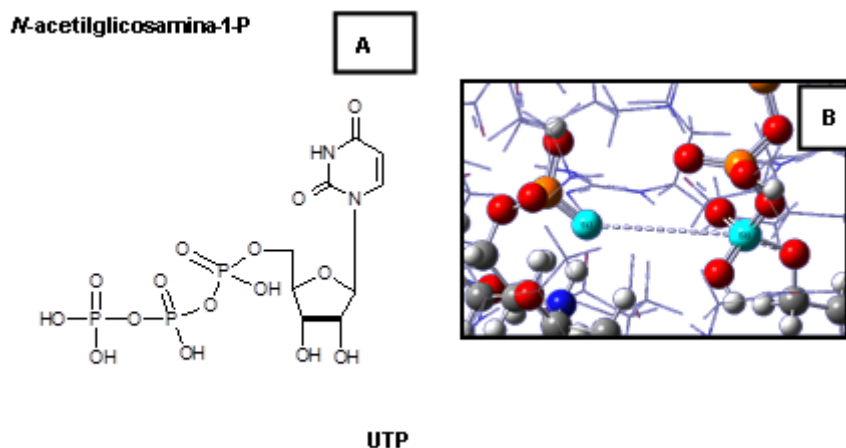
resíduos a uma distância de 5 Å a partir centro geométrico localizado entre os substratos *N*-acetilglicosamina-1-fosfato e UTP. Dessa forma, os resíduos considerados no estudo foram Met109, Ala110, Gly112, Gln113, Gly114, Thr115, Arg116, Leu117, Gly118, Ser119, Ser120, Ala121, Lys123, Leu200, Thr204, Leu210, Ala220, Pro221, Asp222, Gly223, Asn224, Gly225, Gly226, Tyr251, Cys252, Val253, Asp254, Ser289, Val290, Gly291, Val292, Glu304, Asn328, Ile329, Gln330, Glu331, Thr354, Ile355, Arg356, Leu359, Ala380, Tyr382, Leu384, Phe404, Lys408. Esta seleção contempla os resíduos descritos como importantes para a atividade catalítica para outras pirofosforilases [10].



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

Os cálculos QM/MM foram realizados empregando-se o método híbrido denominado de ONIOM [28]. Inicialmente, foi realizada uma variação nas coordenadas atômicas através da aproximação gradativa do átomo de oxigênio do grupo fosfato da *N*-acetilglicosamina-1-P ao átomo de fósforo do fosfato alfa da molécula de UTP. Os oxigênios ligados aos grupamentos fosfatos foram mantidos protonados, enquanto que apenas o oxigênio nucleofílico responsável pelo ataque ficou definido com carga negativa, de modo a perfazer o mecanismo do tipo  $S_N2$ . Para cada etapa de aproximação, somente as distâncias entre o oxigênio e o fósforo permaneciam congeladas e o restante do sistema era completamente refinamento. A Figura 3 esquematiza a variação das coordenadas realizadas. As moléculas reagentes do sistema, *N*-acetilglicosamina-1-P e UTP, foram tratadas com o método semi-empírico

*Parametric Method 6* (PM6) [29] constituindo a camada QM. O método PM6 é parametrizado para todos os elementos do sistema, inclusive para o fósforo. O método PM6 foi aperfeiçoado com a inclusão de orbitais *d*, parâmetros diatômicos. Adicionalmente, o átomo de fósforo foi parametrizado com potencial híbrido para reações de catálise. Como resultado, o desempenho desta parametrização aproxima ao nível teórico MP2/6-311+G(2df,2p), levando a uma diferença menor do que 2 Kcal/mol entre os métodos [30]. Os resíduos circundantes foram tratados com o *Universal Force Field* (UFF) [31], constituindo o método híbrido PM6/UFF. Adicionalmente, nesta etapa foi empregado o método de solvatação implícita *Polarizable Continuum Model* (PCM) [32]. Todos os cálculos QM/MM foram realizados no programa Gaussian 09W e as figuras foram geradas pelo programa GaussView [33, 34].

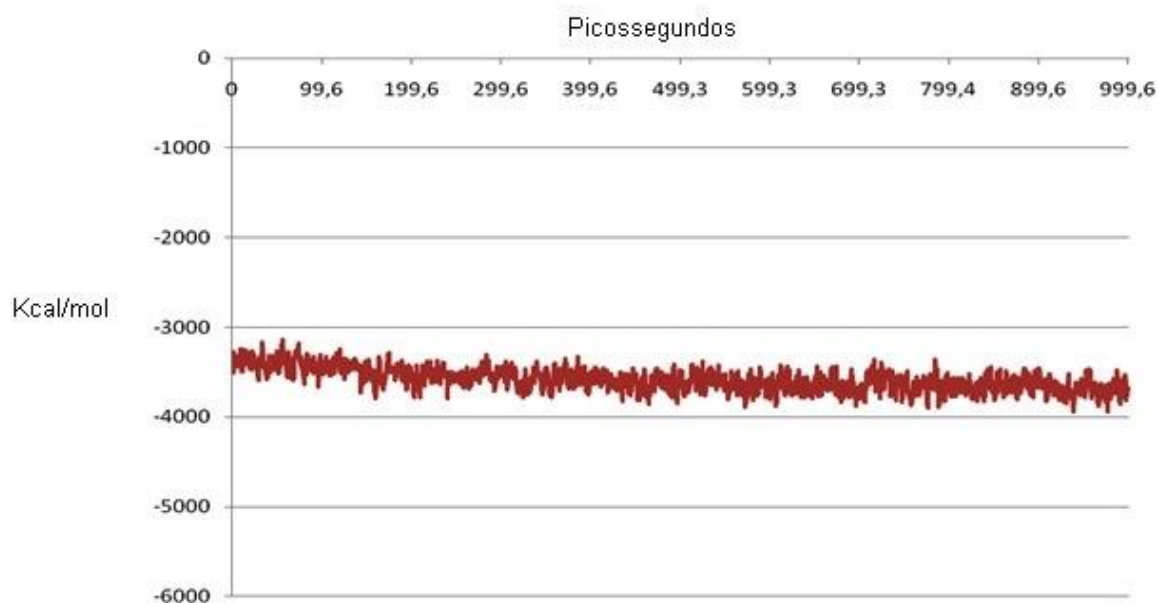


**Figura 3.** Esquema do caminho de reação utilizado para o estudo das coordenadas de reação nos meios aquoso e enzimático. A: representação estrutural; B: representação tridimensional. A região QM está na representação de bolas; enquanto que a região MM está na representação de linhas)

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O complexo enzima-substrato obtido foi refinado corrigindo os choques entre os átomos provenientes do efeito de empacotamento molecular. O sistema foi então submetido aos cálculos de dinâmica molecular para aperfeiçoar o processo de refinamento [35]. A evolução do sistema quanto ao *root mean square deviation* (RMSD) com duração de

1 ns está apresentado na Figura 4. Como pode ser observado, as evoluções do sistema ao longo da trajetória de 1 ns mostra que a estrutura atingiu o equilíbrio após 200 ps de simulação. Como resultado, foi obtido uma estrutura bem próximo do mínimo de energia na superfície potencial. Esta estrutura resultante foi utilizada para estudar o mecanismo de reação.

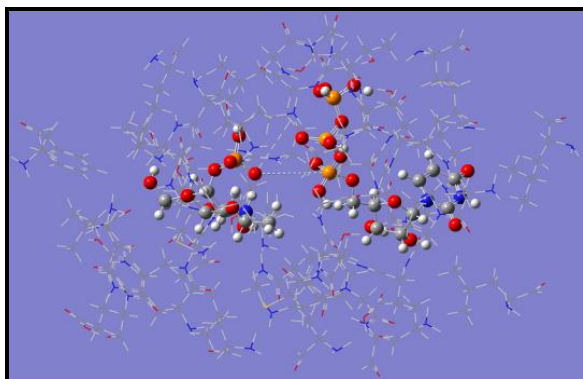


**Figura 4.** Gráfico do desvio RMSD pelo tempo de simulação de 1ns.

O estudo do mecanismo de reação enzimático, executado a partir da estrutura resultante da DM, foi



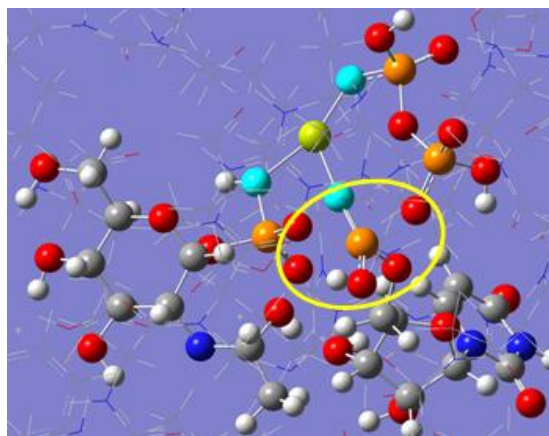
realizado o recorte dos resíduos próximos às moléculas envolvidas na reação. A divisão do sistema nas camadas QM e MM podem ser visualizadas na Figura 5, onde a camada QM consistiu nas moléculas de *N*-acetilglicosamina-1-fosfato, UTP além do cátion divalente de magnésio, tratados pelo método PM6. O restante do sistema foi tratado com o campo de força UFF.



**Figura 5.** A – Divisão das camadas pelo método ONIOM. A representação em bolas e varas define a camada com tratamento quanto-mecânico (alta camada - QM) (*N*-acetilglicosamina-1-fosfato e UTP), enquanto que a representação em fio define a região de tratamento de mecânica molecular (baixa camada - MM).

O ataque do oxigênio ao fosfato  $\alpha$  da estrutura do UTP promoveu a formação de um intermediário com fosfato planar, para a posterior liberação do pirofosfato [19]. Este mecanismo pode ser descrito como  $S_N2(P)$  (existe uma referência ou é uma proposição), devido à semelhança ao processo de substituição  $S_N2$  que ocorre para carbonos tetraédricos. No entanto, existem pequenas diferenças neste mecanismo envolvendo transferências de grupamentos fosfatos. Este possui diferentes mecanismos de formações de fosfatos planares nas estruturas intermediárias. Três possíveis mecanismos de formação da estrutura intermediária para essas transferências foram descritos [19]: A - mecanismo associativo; B - de adição-eliminação; e C - dissociativo. Os mecanismos diferem entre si pelo tempo de formação da ligação do grupo de ataque e de saída. Para um dado sistema, uma dessas vias se destaca sobre as demais prevalecendo como mecanismo principal. Os mesmos autores mostraram evidências de que as enzimas que catalisam transferências de grupos fosfato realizam os três mecanismos, porém, os detalhes que determinam a seletividade por uma das vias ainda não estão suficientemente claros.

A geometria do intermediário de maior energia obtido pelo estudo do caminho da reação de reação através do método QM/MM é ilustrada na Figura 6. Nesta estrutura intermediária, o cátion divalente apresenta distâncias médias de 2,09 Å com os oxigênios do fosfato da *N*-acetilglicosamina-1-fosfato. O cátion também interage com um oxigênio do fosfato  $\alpha$  (distância de 1,90 Å) e um oxigênio do fosfato  $\gamma$  (também 1,90 Å). O magnésio apresenta distâncias de 2,95 e 3,23 Å dos resíduos de Arg116 (contato com um nitrogênio de cadeia lateral) e Ser289 (contato com oxigênio da hidroxila), respectivamente.



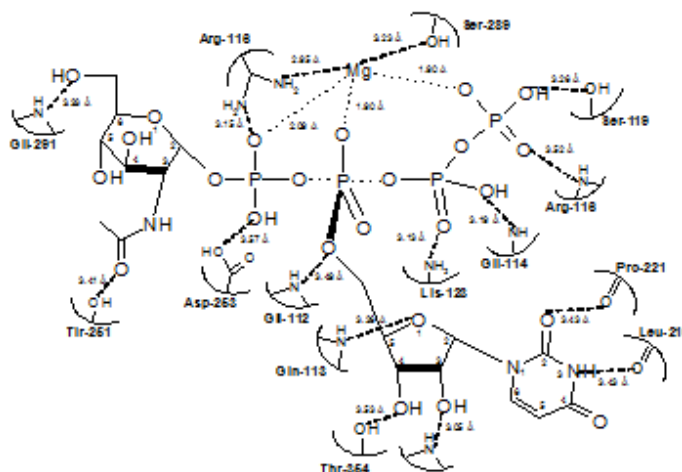
**Figura 6.** Geometria da estrutura de maior energia obtida em meio enzimático. O círculo amarelo evidencia a estrutura do fosfato intermediário.

A análise da geometria do intermediário de maior energia sugere que a sua formação apresente o fosfato atacado com caráter de dissociação, conforme descrito anteriormente (Fig. 7). A estrutura da figura 7 revela uma distância de 2,06 Å entre o oxigênio nucleofílico e o átomo de fósforo atacado do fosfato  $\alpha$  do UTP, e uma distância de 2,01 Å entre o oxigênio do grupo de saída e o mesmo átomo de fósforo. Essas distâncias sugerem que nenhum dos oxigênios se ligue ao grupamento fosfato, o que configura uma estrutura denominada metafosfato. Não foi possível localizar uma única frequência negativa indicando a geometria exata do estado de transição no ponto de maior energia.

Adicionalmente, o intermediário metafosfato se estabiliza por interações com os resíduos de Gli112, Gli113, Arg116, Lis123 e Gli225, resíduos descritos como importantes para a atividade enzimática em outras pirofosforilases [11]. A Gli112 interage com o oxigênio que liga a ribose ao fosfato  $\alpha$ , apresentando 3,49 Å de distância para o nitrogênio deste resíduo. O nitrogênio da Gli113 e o oxigênio

heterocíclico da ribose distam 3,26 Å entre si. O nitrogênio de cadeia lateral da Arg116 interage com o fosfato  $\alpha$  apresentando 3,15 Å de um dos seus oxigênios, o nitrogênio da amina principal deste resíduo apresenta 3,52 Å de um dos oxigênios do fosfato  $\gamma$ . O nitrogênio da cadeia lateral da Lis123 apresenta 3,13 Å de um oxigênio pertencente ao

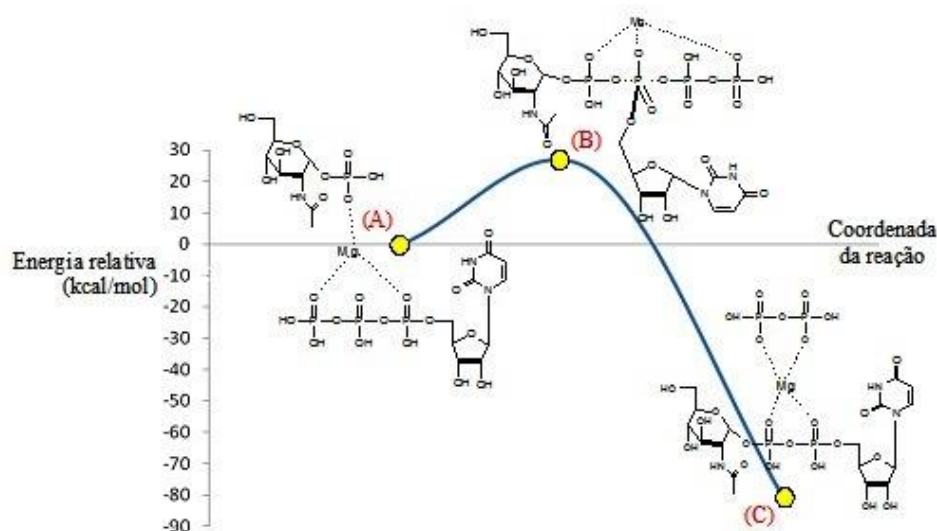
fosfato  $\alpha$ . A Gli225 pode realizar ligação de hidrogênio com a hidroxila substituinte da posição 3 da ribose com o átomo de nitrogênio da amina, que apresenta uma distância de 3,05 Å. As principais interações realizadas com o intermediário metafosfato são esquematizadas na Figura 7.



**Figura 7.** Esquema das interações entre a molécula com o precursor do estado de transição metafosfato, o cátion magnésio e os resíduos da pirofosforilase de *M. perniciosa*.

Através dos cálculos QM/MM foi possível determinar o diagrama de energia para a reação em estudo. A Figura 8 mostra uma reação exotérmica, com diferença de energia entre os reagentes e produtos ( $\Delta G^\circ$ ) de -81,0 Kcal/mol. Adicionalmente, a barreira de ativação estimada foi de ( $\Delta G^\ddagger$ ) 23,5 Kcal/mol, necessária para a formação do produto

UDP-*N*-acetilglicosamina. Os cálculos sugerem que o contato entre o cátion com o pirofosfato inorgânico resultante da reação pode ocasionar a estabilização do sistema por neutralizar a carga do grupo de saída e minimizar as interações eletrostáticas causadas pelos oxigênios, as poderiam estar influenciando de forma negativa para a estabilização do sistema.



**Figura 8.** Energias relativas da reação em meio enzimático: A – reagentes *N*-acetilglicosamina-1-fosfato + UTP, (0 kcal/mol); B – geometria do metafosfato (23,5 kcal/mol); C – produto UDP-*N*-acetilglicosamina + pirofosfato inorgânico (-81,0 kcal/mol).

Os resultados encontrados nestes estudos estão semelhantes aos descritos em trabalhos anteriores [20]. Estes achados indicam que os cátions divalentes ( $Mg^{+2}$  e  $Mn^{+2}$ ) apresentam maiores afinidades ao contato com o pirofosfato inorgânico do que com fosfatos de uridina. Essa maior afinidade pode decorrer justamente por essa neutralização de cargas. Como resultado, ocorre o aumento da eficiência do processo de catálise por estes cátions devido à estabilização das cargas negativas dos oxigênios ligados aos grupamentos fosfatos da molécula de UTP)

#### 4. CONCLUSÃO

O presente trabalho consistiu no estudo teórico do mecanismo catalítico da enzima pirofosforilase do fungo *M. pernicioso* por métodos QM/MM. Seguindo o mecanismo  $S_N2$  proposto, foi determinada a estrutura de um intermediário de maior energia, próximo ao estado de transição, pela variação das coordenadas de reação do sistema. A conformação dessa estrutura sugere um caráter dissociativo, a qual o metafosfato é formado. Esse intermediário metafosfato é estabilizado pelos resíduos Gli112, Gli113, Arg116, Lis123 e Gli225, resíduos descritos como importantes para a atividade enzimática em outras pirofosforilases.

O presente trabalho representa mais uma etapa nos estudos envolvendo o fungo *M. pernicioso* com objetivo de desenvolver um novo agente antifúngico que represente uma alternativa para o controle da vassoura-de-bruxa. A exemplo dos fármacos os quais são análogos do estado de transição, tais como os inibidores de protease e neuraminidase utilizados para o tratamento dos vírus HIV e H1N1, respectivamente, os achados do presente estudo motiva a continuidade na busca de novos inibidores direcionados à enzima pirofosforilase do *M. pernicioso*, aplicando outras metodologias de desenvolvimento de fármacos com auxílio da estrutura.

#### 5. AGRADECIMENTOS

Teles é grato à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB) pela bolsa concedida (termo de outorga nº BOL0298/2009) e a FAPEMIG (CDS-APQ-02337-12). Braga agradece a CAPES pela bolsa PNPd do Programa de Pós-Graduação em C. Farmacêuticas UFSJ.

#### 6. REFERÊNCIAS E NOTAS

- [1] Hebbar, P. K. *Phytopathology* **2007**, *97*, 1658. [\[CrossRef\]](#)
- [2] Meinhardt, L. W.; Rincones, J.; Bailey, B. A.; Aime, M. C.; Griffith, G. W.; Zhang, D.; Pereira, G. A. G. *Mol. Plant Pathol.* **2008**, *9*, 577. [\[CrossRef\]](#)
- [3] Pires, A. B. L.; Gramacho, K. P.; Silva, D. C.; Góes-Neto, A.; Silva, M. M.; Muniz-Sobrinho, J. S.; Porto, R. F.; Villela-Dias, C.; Brendel, M.; Cascardo, J. C. M.; Pereira, G. A. G. *BMC Microbiol.* **2009**, *9*, 158. [\[CrossRef\]](#)
- [4] Pacheco, A. G. M.; Castilho, M. S.; Lucchese, A. M.; Pereira, G.; Taranto, A. G. *Biochem. Biotechnol. Reports* **2013**, *2*, 8. [\[CrossRef\]](#)
- [5] Andrade, B. S.; Taranto, A. G.; Góes-Neto, A.; Duarte, A. A. *Theor. Biol. Med. Model.* **2009**, *6*, 22. [\[CrossRef\]](#)
- [6] Bhasme, P. C.; Kurjogi, M. M.; Sanakal, R. D.; Kaliwal, R. B.; Kaliwal, B. B. *Bioinformation* **2013**, *9*, 339. [\[CrossRef\]](#)
- [7] Sena, A. R.; Júnior, G. L. V.; Neto, A. G.; Taranto, A. G.; Pirovani, C. P.; Cascardo, J. C. M.; Zingali, R. B.; Marcos A. Bezerra, M. A.; Assis, S. A. *An. Acad. Bras. Cienc.* **2011**, *83*, 599. [\[CrossRef\]](#)
- [8] Souza, C. S.; Oliveira, B. M.; Costa, G. G. L.; Schriefer, A.; Selbach-Schnadelbach, A.; Uetanabaro, A. P. T.; Pirovani, C. P.; Pereira, G. A. G.; Taranto, A. G.; Cascardo, J. C. M.; Góes-Neto, A. *J. Microbiol.* **2009**, *47*, 431. [\[CrossRef\]](#)
- [9] Galante, R. S.; Taranto, A. G.; Koblitz, M. G. B.; Góes-Neto, A.; Pirovani, C. P.; Cascardo, J. C. M.; Cruz, S. H.; Pereira, G. A. G.; Assis, S. A. *An. Acad. Bras. Cienc.* **2012**, *84*, 469. [\[CrossRef\]](#)
- [10] Santos Junior, M. C.; Assis, S. A.; Góes-Neto, A.; Duarte, A. A.; Alves, R. J.; Comar Junior, M.; Taranto, A. G. *Chem. Cent. J.* **2013**, *7*, 48. [\[CrossRef\]](#)
- [11] Maruyama, D.; Nishitani, Y.; Nonaka, T.; Kita, A.; Fukami, T. A.; Mio, T.; Yamada-Okabe, H.; Yamada-Okabe, T.; Mik, K. *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 17221. [\[CrossRef\]](#)
- [12] Santos, M. C.; Gonçalves, P. A.; Taranto, A. G.; Koblitz, M. G. B.; Góes-Neto, A.; Pirovani, C. P.; Cascardo, J. C. M.; da Cruz, S. H.; Zingali, R. B.; Pereira, G. A. G.; Dias, C. D.; de Assis, S. A. *J. Braz. Chem. Soc.* **2011**, *22*, 1015. [\[CrossRef\]](#)
- [13] Zhao, H.; Guo, Z. *Drug Discov. Today* **2009**, *14*, 516. [\[CrossRef\]](#)
- [14] Talele, T. T.; Khedkar, S. A.; Rigby, A. C. *Curr. Top. Med. Chem.* **2010**, *10*, 127. [\[CrossRef\]](#)
- [15] Congreve, M.; Murray, C. W.; Blundell, T. L. *Drug Discov. Today* **2005**, *10*, 895. [\[CrossRef\]](#)
- [16] Zhao, Q. J.; Hu, H. G.; Li, Y. W.; Song, Y.; Cai, L. Z.; Wu, Q. Y.; Jiang, Y. Y. *Chem. Biodivers.* **2007**, *4*, 1472. [\[CrossRef\]](#)
- [17] Taranto, A. G.; Carvalho, P.; Avery, M. A. *J. Mol. Graph. Model.* **2008**, *27*, 275. [\[CrossRef\]](#)
- [18] De Andrade, D. V. G.; Góes-Neto, A.; Comar Junior, M.; Taranto, A. G. *Int. J. Quantum Chem.* **2012**, *112*, 3164.



- [19] Whittier, S. K.; Hengge, A. C.; Loria, J. P. *Science* **2013**, *341*, 899. [\[CrossRef\]](#)
- [20] Zea, C. J.; Camci-Unal, G.; Pohl, N. L. *Chem. Cent. J.* **2008**, *2*, 15. [\[CrossRef\]](#)
- [21] Bordoli, L.; Kiefer, F.; Arnold, K.; Benkert, P.; Battey, J.; Schwede, T. *Nat. Protoc.* **2009**, *4*, 1. [\[CrossRef\]](#)
- [22] Taranto, A. G.; Teles, A. L. B.; Araújo, J. Q.; Ferreira, B. A.; Comar, M. *Rev. Ciências Farm. Básica e Apl.* **2012**, *33*, 437.
- [23] Salomon-Ferrer, R.; Case, D. A.; Walker, R. C. *WIREs Comput. Mol. Sci.* **2013**, *3*, 198. [\[CrossRef\]](#)
- [24] Duan, Y.; Wu, C.; Chowdhury, S.; Lee, M. C.; Xiong, G.; Zhang, W.; Yang, R.; Cieplak, P.; Luo, R.; Lee, T.; Caldwell, J.; Wang, J.; Kollman, P. *J. Comput. Chem.* **2003**, *24*, 1999. [\[CrossRef\]](#)
- [25] Case, D. A.; Darden, T. A.; Cheatham, T. E.; Simmerling, C. L.; Wang, J.; Duke, R. E.; Luo, R.; Walker, R. C.; Zhang, W.; Merz, K. M.; Wang, B.; Hayik, S.; Roitberg, A.; Seabra, G.; Kolossváry, I.; Wong, K. F.; Paesani, F.; Vanicek, J.; Liu, J.; Wu, X.; Brozell, S. R.; Steinbrecher, T.; Gohlke, H.; Cai, Q.; Ye, X.; Hsieh, M. -J.; Hornak, V.; Cui, G.; Roe, D. R.; Mathews, D. H.; Seetin, M. G.; Sagui, C.; Babin, V.; Luchko, T.; Gusarov, S.; Kovalenko, A.; Kollman, P. A.; Roberts, B. P. AMBER 11, Univ. California, San Francisco, 2010.
- [26] Sgrignani, J.; Magistrato, A. *Curr. Comput. Aided. Drug Des.* **2013**, *9*, 15. [\[PubMed\]](#)
- [27] Warshel, A.; Levitt, M. J. *Mol. Biol.* **1976**, *103*, 227. [\[CrossRef\]](#)
- [28] Vreven, T.; Byun, K. S.; Komáromi, I.; Dapprich, S.; Montgomery, J. A.; Morokuma, K.; Frisch, M. J. *J. Chem. Theory Comput.* **2006**, *2*, 815. [\[CorssRef\]](#)
- [29] Stewart, J. J. P. *J. Mol. Model.* **2007**, *13*, 1173. [\[CrossRef\]](#)
- [30] Arantes, G. M.; Loos, M. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2006**, *8*, 347. [\[CrossRef\]](#)
- [31] Rappe, A. K.; Casewit, C. J.; Colwell, K. S.; Goddard III, W. A.; Skiff, W. M. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 10024. [\[CrossRef\]](#)
- [32] Tomasi, J.; Mennucci, B.; Cammi, R. *Chem. Rev.* **2005**, *105*, 2999. [\[CrossRef\]](#)
- [33] Gaussian 09, Revision D.01, 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, J. A.; Peralta Junior, 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, J. M.; 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.
- [34] Dennington, J. M. R.; Keith, T. GaussView, Version 5, 2009.
- [35] Silva Junior, J. J.; Comar Junior, M.; Ferreira, B. A.; Taranto, B. A. *Rev. Ciências Farm. Básica Apl.* **2012**, *33*, 591. [\[Link\]](#)