

Modelagem Molecular da Piperina e Análogos como Potenciais Inibidores da Enzima Urease

Débora P. Araujo (PQ)^{1*}, Petronílho de A. Neto (IC)¹

1- Universidade Federal do Espírito Santo - Campus São Mateus

Resumo: A urease é uma metaloenzima de interesse agrônômico e clínico, cuja inibição é a chave para mitigar perdas de nitrogênio em fertilizantes e combater infecções bacterianas, como as causadas por *Helicobacter pylori*. O objetivo deste estudo foi identificar novos inibidores desta enzima a partir da piperina e 112 análogos estruturais, empregando uma abordagem de *docking molecular*. Utilizando a estrutura cristalográfica da urease de *Sporosarcina pasteurii*, os compostos foram avaliados no sítio ativo da enzima com o software GOLD, com as poses geradas avaliadas pela função GoldScore e as pontuações normalizadas em relação ao número de átomos pesados para mitigar vieses de tamanho molecular. A confiabilidade do protocolo foi confirmada pela etapa de *redocking*, que resultou em um valor de RMSD de 1,38 Å. A análise dos resultados revelou que os compostos 1, 2 e 6 estabeleceram interações favoráveis. Contudo, o análogo 5 emergiu como o candidato mais promissor, sendo o único a formar uma interação direta com o íon de níquel e uma ligação de hidrogênio com a lisina carbamilada, alvos essenciais para a inativação enzimática. Conclui-se que a abordagem foi bem-sucedida em selecionar compostos com alto potencial inibitório, destacando o composto 5 para futuros ensaios de validação experimental.

Palavras-chave: urease, *docking molecular*, piperina.

Introdução

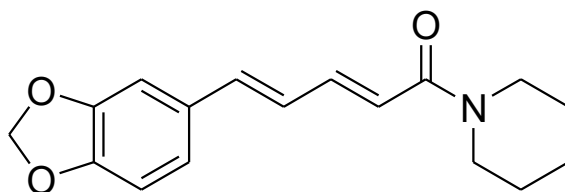
A urease é uma metaloenzima cujo papel central é a hidrólise da ureia, e estabelece como um alvo molecular de duplo interesse: no setor agrícola, sua atividade em solos tratados com fertilizantes acelera a volatilização de amônia, resultando em perdas de nitrogênio e na redução da produtividade; já na saúde humana, é um fator de virulência crítico para microrganismos como a *Helicobacter pylori*, desempenhando um papel central no desenvolvimento de úlceras gástricas e condições inflamatórias (DUARTE, 2023).

A urease é caracterizada por um centro catalítico que contém dois íons de níquel, os quais são coordenados por uma rede de resíduos de aminoácidos — com destaque para histidina e uma lisina carbamilada — indispensáveis para a atividade enzimática (BENINI et al., 1999). As estratégias de inibição, portanto, visam o desenvolvimento de moléculas capazes de quelar esses íons metálicos ou de interagir com resíduos-chave, bloqueando o acesso do substrato ao centro catalítico de forma eficaz (KRAJEWSKA, 2009).

Atualmente, a modelagem molecular se tornou um método indispensável para acelerar a descoberta de novos inibidores, oferecendo um conjunto de ferramentas computacionais de alto desempenho. (GUEDES; DE MAGALHÃES; DARDENNE, 2013). Estudos recentes, utilizando essas abordagens computacionais, identificaram a piperina, um alcaloide presente

na pimenta-do-reino, como um ligante promissor para o sítio ativo da urease (RANI et al., 2023), estabelecendo-o como um potencial fármaco.

Figura 1 – Estrutura química da piperina



Fonte: Produção do próprio autor.

Assim, o objetivo deste trabalho foi aplicar um protocolo de triagem virtual para avaliar sistematicamente a piperina e 100 de seus análogos estruturais como potenciais inibidores da urease, visando identificar novos compostos com maior afinidade e modos de interação favoráveis para estudos futuros.

Metodologia

A metodologia foi baseada na descrita por BATISTA e colaboradores (2021), com modificações.

Obtenção e preparação das estruturas

A estrutura cristalográfica da urease de *Sporosarcina pasteurii* foi obtida do Protein Data Bank (PDB ID: 4UBP). A preparação da macromolécula foi realizada no *software* MAESTRO Schrodinger, utilizando a ferramenta *Protein Preparation Tool*. O processo incluiu a remoção de moléculas de água e do ligante co-cristalizado, a adição de átomos de hidrogênio e a atribuição de estados de protonação em pH fisiológico de 7,4 por meio da ferramenta Epik.

As estruturas tridimensionais do conjunto selecionado de análogos da piperina foram geradas a partir da plataforma *PubChem* e preparadas com o *software OpenBabel* com a protonação das moléculas em pH 7,4.

Procedimento para o docking molecular

O *docking molecular* foi executado com o programa GOLD, reconhecido por sua precisão e confiabilidade (LI et al., 2014). A região de ancoragem foi definida como uma esfera de 12 Å de raio, centrada nas coordenadas do ligante co-cristalizado (x: 28,9430; y: 72,6160; z: 74,6960). Para a análise refinada dos análogos, utilizou-se a função de pontuação

GoldScore com o algoritmo genético configurado para sua máxima eficiência (100%), gerando até 50 poses para cada ligante com a opção de finalização antecipada ativada. As pontuações foram exportadas em formato de planilha e normalizadas em relação ao número de átomos pesados (N_H) da molécula, conforme a Eq. 1, para mitigar vieses relacionados ao tamanho molecular (PAN et al., 2003).

$$Score_{ajustado} = \frac{Score_{original}}{\sqrt[3]{N_H}} \quad (1)$$

As interações moleculares dos 10 complexos mais bem pontuados foram analisadas visualmente no *software Discovery Studio Visualizer*, com foco nas interações com os íons de níquel (Ni798, Ni799) e com resíduos de aminoácidos chave do sítio ativo, como Kcx220, His323, His324, Arg339 e Ala366 (ABID et al., 2010).

Para validar a capacidade do protocolo em reproduzir a pose experimental, foi realizado o *redocking* do ligante co-cristalizado (ácido acetohidroxâmico) na estrutura da enzima.

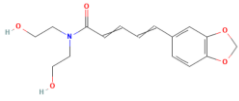
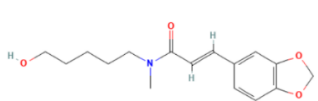
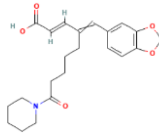
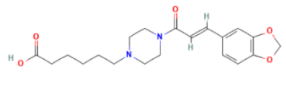
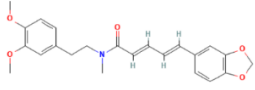
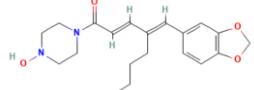
Resultados e Discussão

O protocolo de *docking molecular* foi validado com sucesso pela etapa de *redocking*, que obteve um valor de Desvio Médio Quadrático (RMSD) de 1,38 Å entre a pose predita e a conformação original do ligante co-cristalizado. A validação é considerada bem-sucedida para valores de abaixo de 2,0 Å (BATISTA et al., 2021).

A partir do *docking* dos 113 ligantes foram selecionados os 6 compostos com as maiores pontuações para uma análise aprofundada de suas interações com o sítio ativo da enzima. A Tabela 1, a seguir, apresenta as pontuações de *GoldScore* ajustadas para estes seis análogos mais bem ranqueados.

Os compostos **1**, **2** e **6** demonstraram maior potencial inibitório ao estabelecerem interações cruciais no sítio ativo. O composto **1** formou ligações de hidrogênio com Asp363 e uma interação π - π com His324, ambos resíduos chave para a atividade enzimática. Os compostos **2** e **6** se ligaram a Arg339, e o composto **2** interagiu, adicionalmente, com Kcx220 e His324, sugerindo uma afinidade elevada. Em contrapartida, os compostos **3** e **4** apresentaram interações mais fracas, como ligações alquil e de Van der Waals com resíduos como Ala170 e Ala366, sem formar ligações de hidrogênio diretas com o sítio catalítico, o que indica um potencial inibitório consideravelmente menor.

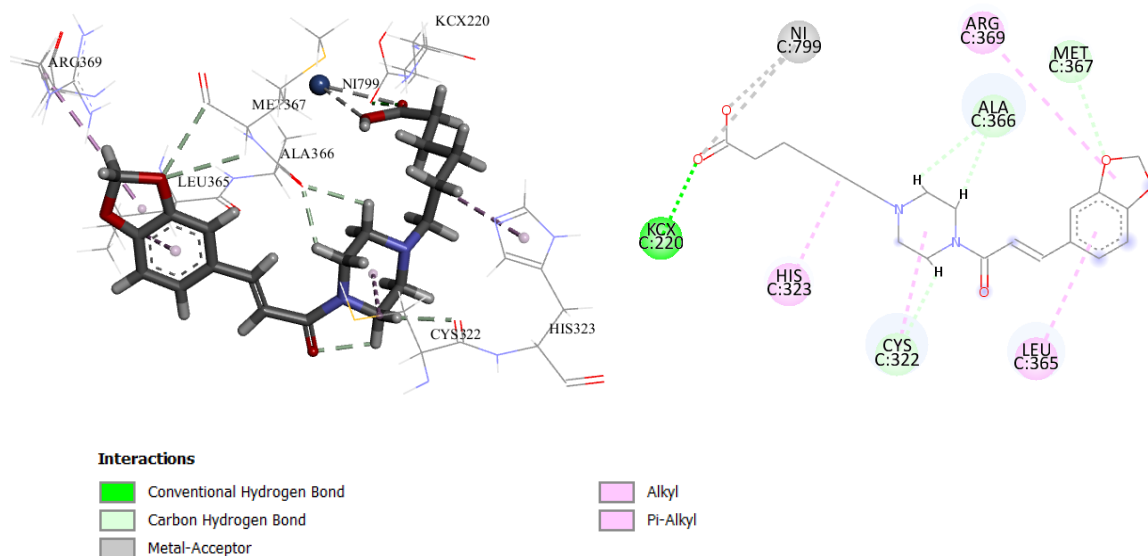
Tabela 1 – Melhores resultados da etapa de refinamento ordenados pelas pontuações ajustadas de *GoldScore*

ID _{Local}	Estrutura e PubChem ID	GoldScore ajustada	ID _{Local}	Estrutura e PubChem ID	GoldScore ajustada
1	 54319598	25,09	4	 107202253	23,76
2	 88779162	24,84	5	 24842187	23,54
3	 53302949	24,23	6	 11956910	23,29

Fonte: Produção do autor.

A análise detalhada das interações revelou distintos padrões de afinidade entre os análogos e a enzima. O composto **5** destacou-se como o mais promissor, sendo o único a apresentar uma interação direta do tipo metal-acceptor com o íon de níquel Ni799, além de uma ligação de hidrogênio convencional com o resíduo de lisina carbamilada (Kcx220), ambos cruciais para a atividade catalítica (Figura 2). Inibidores que interagem com Kcx220 podem desestabilizar a coordenação dos íons de níquel, inibindo a atividade da urease (KRAJEWSKA, 2009).

Figura 2 – Representação 3D (à esquerda) e diagrama 2D (à direita) das interações intermoleculares observadas no *docking molecular* entre do ligante **5** com a enzima urease



Fonte: Produção do autor.

Considerações Finais

A análise aprofundada via *docking molecular* identificou candidatos análogos a piperina com potencial para a inibição da enzima urease. Os resultados fornecem uma base sólida para o avanço dos compostos **1**, **2**, **6** e, especialmente, **5** para as próximas etapas do planejamento de fármacos, incluindo a validação experimental por meio de ensaios *in vitro*.

Agradecimentos

Pesquisa desenvolvida com suporte financeiro do Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento (CNPq), com apoio da Universidade Federal do Espírito Santo.

Referências

ABID, O.-R. et al. Identification of Novel Urease Inhibitors by High-Throughput Virtual and in Vitro Screening. **ACS medicinal chemistry letters**, v. 1, n. 4, p. 145–149, 10 maio 2010.

BATISTA, V. S., FARIAS, R. L., SIMÕES, L. JÚNIOR, N. N. Construção, otimização e ancoragem molecular de substâncias bioativas em biomacromoléculas: um tutorial prático. **Química Nova**, set. 2021.

BENINI, S. et al. **A new proposal for urease mechanism based on the crystal structures of the native and inhibited enzyme from *Bacillus pasteurii*: why urea hydrolysis costs two nickels.** *Structure*, v. 7, n. 2, p. 205–216, fev. 1999.

DUARTE, A. T. F. **Estudos de modelagem molecular, síntese e avaliação da atividade farmacológica de novos compostos potencialmente ativos contra *Helicobacter pylori*.** Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2023.

GUEDES, I. A.; DE MAGALHÃES, C. S.; DARDENNE, L. E. Receptor–ligand molecular docking. **Biophysical Reviews**, v. 6, n. 1, p. 75–87, 21 dez. 2013.

KRAJEWASKA, B. Urease I. Funcional, catalytic and kinetic properties: a review. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 59, p. 9-21. 2009.

LI, Y. et al. Comparative Assessment of Scoring Functions on an Updated Benchmark: 2. Evaluation Methods and General Results. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 54, p. 1717-1736, 2014.

PAN, Y. et al. Consideration of Molecular Weight during Compound Selection in Virtual Target-Based Database Screening. **Journal of Chemical Information and Computer Sciences**, v. 43, n. 1, p. 267–272, 14 nov. 2002.

RANI, L.; RAMAKRISHNAN, L.; VINODHINI, M. et al. Molecular docking study of lead compounds from elathy chooran a siddha formulation against *Helicobacter pylori* urease. **Journal of Pharmaceutical Negative Results**, v. 14, n. 3, p. 1470-1477, 2023.