

LEONARDO PECORARI DE MELO SIMÕES

Validação e triagem virtual de substâncias de padrão estrutural aminoacídico, benzoiltiouréia e tio-hidantoína frente a proteassoma 20S de *L. tarentolae*, visando atividade leishmanicida

Dissertação apresentada ao Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Química

Orientador: Prof. Dr. Nailton Monteiro do Nascimento Júnior

Coorientador: Prof. Dr. Jean Leandro dos Santos

ARARAQUARA  
2022

S593v Simões, Leonardo Pecorari de Melo  
Validação e triagem virtual de substâncias de padrão estrutural aminoacídico, benzoiltiouréia e tio-hidantoina frente a proteassoma 20S de *Leishmania tarentolae*, visando atividade leishmanicida / Leonardo Pecorari de Melo  
Simões. -- Araraquara, 2022  
119 f. : il.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Química, Araraquara  
Orientador: Nailton Monteiro do Nascimento Júnior  
Coorientador: Jean Leandro dos Santos

1. Farmacologia. 2. Inibidores enzimáticos. 3. Estudos de validação. 4. Algoritmos genéticos. 5. Doenças parasitárias. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Química, Araraquara. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

## CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO:

"Validação e triagem virtual de substâncias de padrão estrutural aminoacídico, benzoiltiouréia e tio-hidantoína frente a proteassoma 20S de *L. tarentolae*, visando atividade leishmanicida"

**AUTOR: LEONARDO PECORARI DE MELO SIMÕES**

**ORIENTADOR: NAILTON MONTEIRO DO NASCIMENTO JUNIOR**

**COORIENTADOR: JEAN LEANDRO DOS SANTOS**

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em QUÍMICA, pela Comissão Examinadora:



Prof. Dr. NAILTON MONTEIRO DO NASCIMENTO JÚNIOR (Participação Virtual)  
Departamento de Bioquímica e Química orgânica / Instituto de Química - UNESP -  
Araraquara



Profa. Dra. MARIA LETÍCIA DE CASTRO BARBOSA (Participação Virtual)  
Laboratório de Síntese Orgânica e Química Medicinal (LaSOQuiM) / Universidade Federal do Rio de Janeiro -  
UFRJ - Rio de Janeiro



Profa. Dra. NELILMA CORREIA ROMEIRO (Participação Virtual)  
Núcleo de Pesquisas em Ecologia e Desenvolvimento Social de Macaé (NUPEM) / Universidade Federal do Rio  
de Janeiro - UFRJ - Macaé

Araraquara, 21 de março de 2022

## **DADOS CURRICULARES**

### **IDENTIFICAÇÃO**

Nome: Leonardo Pecorari de Melo Simões

Nome em citações bibliográficas: SIMÕES, L. P. M.; SIMÕES, L.

### **FORMAÇÃO ACADÊMICA/TITULAÇÃO**

Curso de pós-graduação em química, modalidade mestrado, Universidade Estadual Paulista, Câmpus de Araraquara. A defesa foi realizada no dia 21 de março de 2022

Curso de graduação em licenciatura em química, Universidade Estadual Paulista, Câmpus de Presidente Prudente, concluído em 22 de maio de 2019

### **FORMAÇÃO COMPLEMENTAR**

Curso on-line de farmacologia básica (Carga horária: 10 horas), realizado em plataforma on-line de compartilhamento de vídeos, entre os dias 25 e 30 de agosto de 2020

Curso de espectroscopia de impedância eletroquímica (Carga horária: 3 horas), Universidade Estadual Paulista, Câmpus de Presidente Prudente, realizado no dia 29 de novembro de 2017

### **PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA**

#### **Artigos completos publicados e aceitos para publicação em periódicos**

BATISTA, V. S.; FARIAS, R. L.; SIMÕES, L. P. M.; NASCIMENTO-JÚNIOR, N. M.. Construção, otimização e ancoragem molecular de substâncias bioativas em biomacromoléculas: um tutorial prático, v. 45, n. 2, p. 223-234, 2022

LANFREDI, S.; STORTI, F.; SIMÕES, L. P. M.; DJURADO, E.; NOBRE, M. A. L.. Synthesis and structural characterization of calcium titanate by spray pyrolysis method. MATERIALS LETTERS, v. 201, p. 148-151, 2017

#### **Trabalhos publicados em anais de eventos científicos**

SIMÕES, L.; SANTOS, J. L.; NASCIMENTO JUNIOR, N. M.. Validation of 20S proteasome model of Leishmania tarentolae for the design of novel antileishmanial drugs. 43ª Reunião Anual Virtual da SBQ, 2020

SIMÕES, L. P. M.; LANFREDI, S.; NOBRE, M. A. L.. Síntese, caracterização estrutural e elétrica de titanato de cálcio dopado com cátions de cobre e potássio. 30º Congresso de Iniciação Científica da Unesp, 2018

SIMÕES, L. P. M.; FARIA, P. C.; NOBRE, M.A.L.; LANFREDI, S.. Análise do potencial fotocatalítico de um compósito híbrido de óxido semicondutor com carbono amorfo. 61º Congresso Brasileiro de Cerâmica, 2017

SIMÕES, L. P. M.; LANFREDI, S.; NOBRE, M. A. L.. Síntese, caracterização estrutural e análise do potencial fotocatalítico de um novo niobato de estrutura tungstênio bronze. 61º Congresso Brasileiro de Cerâmica, 2017

LANFREDI, S.; STORTI, F.; SIMÕES, L. P. M.; MASSON, G. H. C.; DJURADO, E.; NOBRE, M. A. L.. Análise por microscopia eletrônica de transmissão de nanopós de estrutura perovskita dupla obtidos pelo método de spray pirólise. 61º Congresso Brasileiro de Cerâmica, 2017

NOBRE, M. A. L.; SIMÕES, L. P. M.; BELLUCCI, F. S.; MASSON, G. H. C.; LANFREDI, S.. Correlação entre o deslocamento do cátion polar e evolução do caráter covalente em niobatos alcalinos ferroelétricos. 61º Congresso Brasileiro de Cerâmica, 2017

LANFREDI, S.; FARIA, P. C.; SIMÕES, L. P. M.; POTENSA, B. S.; NOBRE, M. A. L.. Photocatalytic potential of non-stoichiometric polycation oxides based on the niobates solid solution. XVI Brazil MRS Meeting, 2017

SIMÕES, L. P. M.; LANFREDI, S.; FARIA, P. C.; NOBRE, M. A. L.. Análise da atividade fotocatalítica de um compósito híbrido de ZnO com carbono amorfo. XXIX Congresso de Iniciação Científica da Unesp, 2017

SIMÕES, L. P. M.; LANFREDI, S.; SILVEIRA, G. S.; NOBRE, M. A. L.. Síntese e caracterização estrutural de um novo óxido niobato de estrutura tungstênio bronze. XXVIII Congresso de Iniciação Científica da Unesp, 2016

BALBINO, M. T.; LANFREDI, S.; SIMÕES, L. P. M.; NOBRE, M. A. L.. Síntese de niobato alcalino de estrutura perovskita para a produção de biodiesel via catálise heterogênea. XXVIII Congresso de Iniciação Científica da Unesp, 2016

## **PARTICIPAÇÃO EM EVENTOS CIENTÍFICOS**

3ª Escola de Modelagem Molecular da Unesp, evento realizado em plataforma on-line de compartilhamento de vídeos, entre os dias 11 e 15 de janeiro de 2021

30º Congresso de Iniciação Científica da Unesp, Câmpus de Presidente Prudente, realizado entre os dias 24 e 25 de setembro de 2018

61º Congresso Brasileiro de Cerâmica, Centro de Convenções da Fundação de Apoio da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Gramado, Rio Grande do Sul, Brasil, realizado entre os dias 4 e 7 de junho de 2017

VI Semana da Química de Presidente Prudente, Universidade Estadual Paulista, Câmpus de Presidente Prudente, realizado entre os dias 27 de novembro e 1 de dezembro de 2017

XXIX Congresso de Iniciação Científica da Unesp, Câmpus de Presidente Prudente, realizado entre os dias 21 e 22 de setembro de 2017

XXVIII Congresso de Iniciação Científica da Unesp, Câmpus de Presidente Prudente,  
realizado entre os dias 22 e 23 de setembro de 2016

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Prof. Dr. Nailton pela confiança e orientação integral proporcionada, graças às suas excelentes qualidades como professor e pesquisador.

Ao Prof. Dr. Jean por rapidamente ter nos informado sobre a publicação de um artigo referente à descoberta de um inibidor da proteassoma de parasitos do gênero *Leishmania*.

Aos membros do Laboratório de Química Medicinal, Síntese Orgânica e Modelagem Molecular (LaQMedSOMM), pelas profícuas discussões científicas realizadas durante as reuniões de grupo.

À Profa. Dra. Marcelle por ter fornecido e permitido a inclusão das benzoiltiouréias e tio-hidantoínas nesse trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa concedida, modalidade mestrado, processo 146050/2019-3.

## RESUMO

A leishmaniose visceral é uma doença transmitida por vetor e é causada por parasitos do gênero *Leishmania*. Se não tratada, a doença pode ser fatal em mais de 95% dos casos. No Brasil, 1933 casos de leishmaniose visceral e 165 óbitos causados pela doença foram registrados em 2020. A leishmaniose visceral possui tratamento, incluindo o uso de anfotericina B e sais de antimônio pentavalente. A maioria dos fármacos disponíveis são administrados via parenteral, apresentam efeitos adversos graves, como, por exemplo, cardiotoxicidade e pancreatite, e, além disso, não possuem modo de ação conhecido. Nesse sentido, há uma demanda por novos fármacos que reúnam um perfil seguro e modo de ação claro no tratamento da doença. Recentemente, com a descoberta de dois potenciais candidatos a fármacos para o tratamento da leishmaniose visceral, denominados LXE408 e GSK3494245, foi demonstrado que a proteassoma 20S é um promissor alvo terapêutico para o desenvolvimento de novos fármacos com atividade leishmanicida. A proteassoma dos eucariotos desempenha um papel importante na degradação intracelular de proteínas, clivando ligações peptídicas de uma ampla combinação de resíduos de aminoácidos. Dessa maneira, ela regula diferentes processos biológicos como, por exemplo, apoptose e controle do ciclo celular. A inibição da referida enzima dos parasitos diminui a carga parasitária e, além disso, a estrutura da proteassoma 20S dos parasitos apresenta diferenças importantes em comparação com a humana. Neste trabalho, um modelo computacional da proteassoma 20S da espécie *L. tarentolae* foi criado, empregando-se a estrutura tridimensional da referida enzima complexada com o ligante GSK3494245. A validação do modelo computacional foi feita por redocagem de GSK3494245 no sítio de ligação da proteína. Em seguida, 243 substâncias, abrangendo 128 derivados aminoacídicos, 103 benzoiltiouréias e 12 tio-hidantoínas, foram triadas virtualmente no modelo computacional. Por fim, 10 ligantes, de cada um dos 3 conjuntos, com potencial atividade inibitória frente à proteassoma 20S dos parasitos, foram eleitos. Os 30 ligantes eleitos serão sintetizados, caracterizados estruturalmente e submetidos a ensaios in vitro contra amastigotas de *L. donovani* situados dentro de macrófagos.

**Palavras-chave:** *Leishmania*; leishmaniose visceral; proteassoma 20S; SBDD; ancoragem molecular.



## ABSTRACT

Visceral leishmaniasis is a vector-borne disease caused by parasites of the genus *Leishmania*. If left untreated, the disease can be fatal in more than 95% of cases. In Brazil, 1933 cases of visceral leishmaniasis and 165 deaths caused by the disease were reported in 2020. Visceral leishmaniasis has treatment, which includes the use of amphotericin B and pentavalent antimony salts. Most of the available drugs are administered parenterally, present serious adverse effects, such as cardiotoxicity and pancreatitis, and have an unknown mode of action. In this scenario, there is a need for new drugs that bring together a safe profile and a clear mode of action in the treatment of the disease. Recently, the discovery of two potential drug candidates for the treatment of visceral leishmaniasis, termed LXE408 and GSK3494245, revealed that the 20S proteasome is a promising therapeutic target for the development of new drugs with leishmanicidal activity. The proteasome of eukaryotes plays a key role in intracellular protein degradation by cleaving peptide bonds from a broad combination of amino acid residues. Thus, it regulates different biological processes such as apoptosis and cell cycle control. Inhibition of this enzyme from parasites decreases the parasite burden and the structure of the 20S proteasome from parasites exhibits important differences in comparison with the human structure. In this work, a computational model of the 20S proteasome of the specie *L. tarentolae* was created by using the three-dimensional structure of this enzyme complexed with the ligand GSK3494245. Validation of the computational model was performed by redocking of GSK3494245 at the binding site of the protein. Then, 243 substances, comprising 128 amino acid derivatives, 103 benzoylthioureas, and 12 thiohydantoins, were virtually screened into the 20S proteasome. Then, 30 ligands, 10 from each of the 3 sets, with potential inhibitory activity against the 20S proteasome were chosen. The 30 chosen ligands will be synthesized, structurally characterized, and submitted to in vitro assays against *L. donovani* intramacrophage amastigotes.

**Keywords:** *Leishmania*; visceral leishmaniasis; 20S proteasome; SBDD; molecular docking.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> — O ciclo de vida do parasito do gênero <i>Leishmania</i> .....	20
<b>Figura 2</b> — Fórmula estrutural de fármacos utilizados no tratamento da leishmaniose visceral. Os valores de $CI_{50}$ são baseados na espécie <i>L. donovani</i> . Imagem gerada no programa ChemDraw, versão 12.0.2.1076.....	22
<b>Figura 3</b> — Estrutura da proteassoma 20S de <i>L. tanrentolae</i> (PDB ID 6QM7). Imagem gerada com os programas DSV e Corel PHOTO-PAINT, versões 21.1.0.20298 e 22.0.0.412, respectivamente .....	26
<b>Figura 4</b> — Esquematização das mudanças estruturais iniciadas em <b>6</b> que resultaram em <b>10</b> . Os valores de $CE_{50}$ são baseados na espécie <i>L. donovani</i> . Imagem gerada no programa ChemDraw, versão 18.1.0.535 .....	27
<b>Figura 5</b> — Sobreposição entre <b>10</b> e <b>20</b> no sítio de ligação da proteassoma 20S de <i>L. tarentolae</i> (PDB ID 6TCZ e 6QM7, respectivamente). Os átomos de carbono, flúor, nitrogênio e oxigênio dos ligantes estão coloridos em preto, ciano, azul e vermelho, respectivamente. Todos os átomos dos resíduos de aminoácidos das subunidades $\alpha 4$ e $\alpha 5$ estão coloridos em azul e vermelho, respectivamente. Os átomos de hidrogênio foram omitidos para melhor clareza. Imagem gerada com os programas DSV e Corel PHOTO-PAINT, versões 21.1.0.20298 e 22.0.0.412, respectivamente .....	28
<b>Figura 6</b> — Evolução das séries de <b>11</b> até <b>20</b> . Os valores de $CE_{50}$ são baseados contra amastigotas de <i>L. donovani</i> situados dentro de macrófagos. Imagem gerada no programa ChemDraw, versão 18.1.0.535 .....	30
<b>Figura 7</b> — <b>a)</b> Modo de ligação de <b>10</b> na estrutura 6TCZ. Os átomos de carbono, flúor, nitrogênio e oxigênio estão coloridos em preto, ciano, azul e vermelho, respectivamente. Os átomos de hidrogênio foram omitidos para melhor clareza <b>b)</b> Fórmula estrutural de <b>10</b> . Imagem gerada com os programas DSV e Corel PHOTO-PAINT, versões 21.1.0.20298 e 22.0.0.412, respectivamente .....	37
<b>Figura 8</b> — <b>a)</b> Modo de ligação de <b>20</b> na estrutura 6QM7. Os átomos de carbono, flúor, nitrogênio e oxigênio estão coloridos em preto, ciano, azul e vermelho, respectivamente. Os átomos de hidrogênio foram omitidos para melhor clareza <b>b)</b> Fórmula estrutural de <b>20</b> . Imagem gerada com os programas DSV e Corel PHOTO-PAINT, versões 21.1.0.20298 e 22.0.0.412, respectivamente .....	38

<b>Figura 9</b> — <b>a)</b> Fórmula estrutural dos ligantes <b>10</b> e <b>20</b> <b>b)</b> Requisito estrutural básico observado nos ligantes <b>10</b> e <b>20</b> <b>c)</b> Estrutura geral dos 128 derivados aminoacídicos planejados. Imagem gerada no programa ChemDraw Pro, versão 12.0.2.1076.....	40
<b>Figura 10</b> — Estrutura geral <b>a)</b> das benzoiltiouréias e <b>b)</b> das tio-hidantoínas. Imagem gerada no programa ChemDraw Pro, versão 12.0.2.1076.....	41
<b>Figura 11</b> — Sobreposição entre a estrutura tridimensional de <b>20</b> obtida experimentalmente (átomos coloridos em vermelho) com a pose estimada pela função de pontuação ChemPLP (átomos coloridos em azul). Os átomos de hidrogênio foram omitidos para maior clareza. Imagem gerada por meio dos programas DSV e Paint, versão 21.1.0.20298 e 20H2, respectivamente.....	44
<b>Figura 12</b> — <b>a)</b> Modo de ligação da melhor pose de <b>94</b> na estrutura 6QM7. Os átomos de carbono, nitrogênio e oxigênio estão coloridos em preto, azul e vermelho, respectivamente. Os átomos de hidrogênio foram omitidos para melhor clareza <b>b)</b> Fórmula estrutural de <b>94</b> . Imagem gerada com os programas DSV e Corel PHOTO-PAINT, versões 21.1.0.20298 e 22.0.0.412, respectivamente.....	46
<b>Figura 13</b> — <b>a)</b> Modo de ligação da melhor pose de <b>92</b> na estrutura 6QM7. Os átomos de carbono, nitrogênio e oxigênio estão coloridos em preto, azul e vermelho, respectivamente. Os átomos de hidrogênio foram omitidos para melhor clareza <b>b)</b> Fórmula estrutural de <b>92</b> . Imagem gerada com os programas DSV e Corel PHOTO-PAINT, versões 21.1.0.20298 e 22.0.0.412, respectivamente.....	47
<b>Figura 14</b> — <b>a)</b> Modo de ligação da melhor pose de <b>70</b> na estrutura 6QM7. Os átomos de carbono, nitrogênio e oxigênio estão coloridos em preto, azul e vermelho, respectivamente. Os átomos de hidrogênio foram omitidos para melhor clareza <b>b)</b> Fórmula estrutural de <b>70</b> . Imagem gerada com os programas DSV e Corel PHOTO-PAINT, versões 21.1.0.20298 e 22.0.0.412, respectivamente.....	48
<b>Figura 15</b> — <b>a)</b> Modo de ligação da melhor pose de <b>78</b> na estrutura 6QM7. Os átomos de carbono, nitrogênio e oxigênio estão coloridos em preto, azul e vermelho, respectivamente. Os átomos de hidrogênio foram omitidos para melhor clareza <b>b)</b> Fórmula estrutural de <b>78</b> . Imagem gerada com os programas DSV e Corel PHOTO-PAINT, versões 21.1.0.20298 e 22.0.0.412, respectivamente.....	49
<b>Figura 16</b> — <b>a)</b> Modo de ligação da melhor pose de <b>97</b> na estrutura 6QM7. Os átomos de carbono, nitrogênio e oxigênio estão coloridos em preto, azul e vermelho, respectivamente. Os átomos de hidrogênio foram omitidos para melhor clareza <b>b)</b>	

Fórmula estrutural de <b>97</b> . Imagem gerada com os programas DSV e Corel PHOTO-PAINT, versões 21.1.0.20298 e 22.0.0.412, respectivamente .....	50
<b>Figura 17</b> — a) Modo de ligação da melhor pose de <b>98</b> na estrutura 6QM7. Os átomos de carbono, nitrogênio e oxigênio estão coloridos em preto, azul e vermelho, respectivamente. Os átomos de hidrogênio foram omitidos para melhor clareza b) Fórmula estrutural de <b>98</b> . Imagem gerada com os programas DSV e Corel PHOTO-PAINT, versões 21.1.0.20298 e 22.0.0.412, respectivamente .....	51
<b>Figura 18</b> — a) Modo de ligação da melhor pose de <b>102</b> na estrutura 6QM7. Os átomos de carbono, nitrogênio e oxigênio estão coloridos em preto, azul e vermelho, respectivamente. Os átomos de hidrogênio foram omitidos para melhor clareza b) Fórmula estrutural de <b>102</b> . Imagem gerada com os programas DSV e Corel PHOTO-PAINT, versões 21.1.0.20298 e 22.0.0.412, respectivamente .....	52
<b>Figura 19</b> — a) Modo de ligação da melhor pose de <b>99</b> na estrutura 6QM7. Os átomos de carbono, nitrogênio e oxigênio estão coloridos em preto, azul e vermelho, respectivamente. Os átomos de hidrogênio foram omitidos para melhor clareza b) Fórmula estrutural de <b>99</b> . Imagem gerada com os programas DSV e Corel PHOTO-PAINT, versões 21.1.0.20298 e 22.0.0.412, respectivamente .....	53
<b>Figura 20</b> — a) Modo de ligação da melhor pose de <b>111</b> na estrutura 6QM7. Os átomos de carbono, nitrogênio e oxigênio estão coloridos em preto, azul e vermelho, respectivamente. Os átomos de hidrogênio foram omitidos para melhor clareza b) Fórmula estrutural de <b>111</b> . Imagem gerada com os programas DSV e Corel PHOTO-PAINT, versões 21.1.0.20298 e 22.0.0.412, respectivamente .....	54
<b>Figura 21</b> — a) Modo de ligação da melhor pose de <b>110</b> na estrutura 6QM7. Os átomos de carbono, nitrogênio e oxigênio estão coloridos em preto, azul e vermelho, respectivamente. Os átomos de hidrogênio foram omitidos para melhor clareza b) Fórmula estrutural de <b>110</b> . Imagem gerada com os programas DSV e Corel PHOTO-PAINT, versões 21.1.0.20298 e 22.0.0.412, respectivamente .....	55
<b>Figura 22</b> — a) Modo de ligação da melhor pose de <b>188</b> na estrutura 6QM7. Os átomos de carbono, enxofre, nitrogênio e oxigênio estão coloridos em preto, amarelo, azul e vermelho, respectivamente. Os átomos de hidrogênio foram omitidos para melhor clareza b) Fórmula estrutural de <b>188</b> . Imagem gerada com os programas DSV e Corel PHOTO-PAINT, versões 21.1.0.20298 e 22.0.0.412, respectivamente .....	57
<b>Figura 23</b> — a) Modo de ligação da melhor pose de <b>192</b> na estrutura 6QM7. Os átomos de carbono, enxofre, nitrogênio e oxigênio estão coloridos em preto, amarelo,	

azul e vermelho, respectivamente. Os átomos de hidrogênio foram omitidos para melhor clareza **b)** Fórmula estrutural de **192**. Imagem gerada com os programas DSV e Corel PHOTO-PAINT, versões 21.1.0.20298 e 22.0.0.412, respectivamente .....58

**Figura 24** — **a)** Modo de ligação da melhor pose de **222** na estrutura 6QM7. Os átomos de carbono, enxofre, nitrogênio e oxigênio estão coloridos em preto, amarelo, azul e vermelho, respectivamente. Os átomos de hidrogênio foram omitidos para melhor clareza **b)** Fórmula estrutural de **222**. Imagem gerada com os programas DSV e Corel PHOTO-PAINT, versões 21.1.0.20298 e 22.0.0.412, respectivamente .....59

**Figura 25** — **a)** Modo de ligação da melhor pose de **249** na estrutura 6QM7. Os átomos de carbono, enxofre, nitrogênio e oxigênio estão coloridos em preto, amarelo, azul e vermelho, respectivamente. Os átomos de hidrogênio foram omitidos para melhor clareza **b)** Fórmula estrutural de **249**. Imagem gerada com os programas DSV e Corel PHOTO-PAINT, versões 21.1.0.20298 e 22.0.0.412, respectivamente .....60

**Figura 26** — **a)** Modo de ligação da melhor pose de **172** na estrutura 6QM7. Os átomos de carbono, enxofre, nitrogênio e oxigênio estão coloridos em preto, amarelo, azul e vermelho, respectivamente. Os átomos de hidrogênio foram omitidos para melhor clareza **b)** Fórmula estrutural de **172**. Imagem gerada com os programas DSV e Corel PHOTO-PAINT, versões 21.1.0.20298 e 22.0.0.412, respectivamente .....61

**Figura 27** — **a)** Modo de ligação da melhor pose de **182** na estrutura 6QM7. Os átomos de carbono, enxofre, nitrogênio e oxigênio estão coloridos em preto, amarelo, azul e vermelho, respectivamente. Os átomos de hidrogênio foram omitidos para melhor clareza **b)** Fórmula estrutural de **182**. Imagem gerada com os programas DSV e Corel PHOTO-PAINT, versões 21.1.0.20298 e 22.0.0.412, respectivamente .....61

**Figura 28** — **a)** Modo de ligação da melhor pose de **183** na estrutura 6QM7. Os átomos de carbono, enxofre, nitrogênio e oxigênio estão coloridos em preto, amarelo, azul e vermelho, respectivamente. Os átomos de hidrogênio foram omitidos para melhor clareza **b)** Fórmula estrutural de **183**. Imagem gerada com os programas DSV e Corel PHOTO-PAINT, versões 21.1.0.20298 e 22.0.0.412, respectivamente .....62

**Figura 29** — **a)** Modo de ligação da melhor pose de **184** na estrutura 6QM7. Os átomos de carbono, enxofre, nitrogênio e oxigênio estão coloridos em preto, amarelo, azul e vermelho, respectivamente. Os átomos de hidrogênio foram omitidos para melhor clareza **b)** Fórmula estrutural de **184**. Imagem gerada com os programas DSV e Corel PHOTO-PAINT, versões 21.1.0.20298 e 22.0.0.412, respectivamente .....63

**Figura 30** — **a)** Modo de ligação da melhor pose de **185** na estrutura 6QM7. Os átomos de carbono, cloro, enxofre, nitrogênio e oxigênio estão coloridos em preto, verde, amarelo, azul e vermelho, respectivamente. Os átomos de hidrogênio foram omitidos para melhor clareza **b)** Fórmula estrutural de **185**. Imagem gerada com os programas DSV e Corel PHOTO-PAINT, versões 21.1.0.20298 e 22.0.0.412, respectivamente .....64

**Figura 31** — **a)** Modo de ligação da melhor pose de **186** na estrutura 6QM7. Os átomos de carbono, enxofre, nitrogênio e oxigênio estão coloridos em preto, amarelo, azul e vermelho, respectivamente. Os átomos de hidrogênio foram omitidos para melhor clareza **b)** Fórmula estrutural de **186**. Imagem gerada com os programas DSV e Corel PHOTO-PAINT, versões 21.1.0.20298 e 22.0.0.412, respectivamente .....65

**Figura 32** — **a)** Modo de ligação da melhor pose de **256** na estrutura 6QM7. Os átomos de carbono, enxofre, nitrogênio e oxigênio estão coloridos em preto, amarelo, azul e vermelho, respectivamente. Os átomos de hidrogênio foram omitidos para melhor clareza **b)** Fórmula estrutural de **256**. Imagem gerada com os programas DSV e Corel PHOTO-PAINT, versões 21.1.0.20298 e 22.0.0.412, respectivamente .....66

**Figura 33** — **a)** Modo de ligação da melhor pose de **258** na estrutura 6QM7. Os átomos de carbono, enxofre, nitrogênio e oxigênio estão coloridos em preto, amarelo, azul e vermelho, respectivamente. Os átomos de hidrogênio foram omitidos para melhor clareza **b)** Fórmula estrutural de **258**. Imagem gerada com os programas DSV e Corel PHOTO-PAINT, versões 21.1.0.20298 e 22.0.0.412, respectivamente .....66

**Figura 34** — **a)** Modo de ligação da melhor pose de **262** na estrutura 6QM7. Os átomos de carbono, enxofre, nitrogênio e oxigênio estão coloridos em preto, amarelo, azul e vermelho, respectivamente. Os átomos de hidrogênio foram omitidos para melhor clareza **b)** Fórmula estrutural de **262**. Imagem gerada com os programas DSV e Corel PHOTO-PAINT, versões 21.1.0.20298 e 22.0.0.412, respectivamente .....67

**Figura 35** — **a)** Modo de ligação da melhor pose de **263** na estrutura 6QM7. Os átomos de carbono, enxofre, nitrogênio e oxigênio estão coloridos em preto, amarelo, azul e vermelho, respectivamente. Os átomos de hidrogênio foram omitidos para melhor clareza **b)** Fórmula estrutural de **263**. Imagem gerada com os programas DSV e Corel PHOTO-PAINT, versões 21.1.0.20298 e 22.0.0.412, respectivamente .....68

**Figura 36** — **a)** Modo de ligação da melhor pose de **257** na estrutura 6QM7. Os átomos de carbono, enxofre, nitrogênio e oxigênio estão coloridos em preto, amarelo, azul e vermelho, respectivamente. Os átomos de hidrogênio foram omitidos para

melhor clareza **b)** Fórmula estrutural de **257**. Imagem gerada com os programas DSV e Corel PHOTO-PAINT, versões 21.1.0.20298 e 22.0.0.412, respectivamente .....69

**Figura 37** — **a)** Modo de ligação da melhor pose de **260** na estrutura 6QM7. Os átomos de carbono, enxofre, nitrogênio e oxigênio estão coloridos em preto, amarelo, azul e vermelho, respectivamente. Os átomos de hidrogênio foram omitidos para melhor clareza **b)** Fórmula estrutural de **260**. Imagem gerada com os programas DSV e Corel PHOTO-PAINT, versões 21.1.0.20298 e 22.0.0.412, respectivamente .....70

**Figura 38** — **a)** Modo de ligação da melhor pose de **261** na estrutura 6QM7. Os átomos de carbono, enxofre, nitrogênio e oxigênio estão coloridos em preto, amarelo, azul e vermelho, respectivamente. Os átomos de hidrogênio foram omitidos para melhor clareza **b)** Fórmula estrutural de **261**. Imagem gerada com os programas DSV e Corel PHOTO-PAINT, versões 21.1.0.20298 e 22.0.0.412, respectivamente .....70

**Figura 39** — **a)** Modo de ligação da melhor pose de **264** na estrutura 6QM7. Os átomos de carbono, enxofre, nitrogênio e oxigênio estão coloridos em preto, amarelo, azul e vermelho, respectivamente. Os átomos de hidrogênio foram omitidos para melhor clareza **b)** Fórmula estrutural de **264**. Imagem gerada com os programas DSV e Corel PHOTO-PAINT, versões 21.1.0.20298 e 22.0.0.412, respectivamente .....71

**Figura 40** — **a)** Modo de ligação da melhor pose de **253** na estrutura 6QM7. Os átomos de carbono, enxofre, nitrogênio e oxigênio estão coloridos em preto, amarelo, azul e vermelho, respectivamente. Os átomos de hidrogênio foram omitidos para melhor clareza **b)** Fórmula estrutural de **253**. Imagem gerada com os programas DSV e Corel PHOTO-PAINT, versões 21.1.0.20298 e 22.0.0.412, respectivamente .....72

**Figura 41** — **a)** Modo de ligação da melhor pose de **254** na estrutura 6QM7. Os átomos de carbono, enxofre, nitrogênio e oxigênio estão coloridos em preto, amarelo, azul e vermelho, respectivamente. Os átomos de hidrogênio foram omitidos para melhor clareza **b)** Fórmula estrutural de **254**. Imagem gerada com os programas DSV e Corel PHOTO-PAINT, versões 21.1.0.20298 e 22.0.0.412, respectivamente .....73

## LISTA DE QUADROS

<b>Quadro 1</b> — Espécies e subgêneros de parasitos causadores da leishmaniose nos seres humanos.....	18
<b>Quadro 2</b> — Tratamentos da leishmaniose visceral nas regiões endêmicas da África, Ásia e América Latina .....	24
<b>Quadro 3</b> — Resíduos de aminoácidos da proteassoma 20S, das espécies <i>L. tarentolae</i> e <i>L. donovani</i> , os quais compõem o sítio de ligação de <b>20</b> , que são diferentes da referida enzima da espécie <i>H. sapiens</i> . Os resíduos que compõem o bolsão hidrofóbico do sítio de ligação estão destacados em negrito.....	29
<b>Quadro 4</b> — Exemplos de funções de pontuação implementadas em programas de ancoragem molecular .....	34
<b>Quadro 5</b> — 7 resíduos de aminoácidos do sítio de ligação que interagem com ambos os ligantes, <b>10</b> e <b>20</b> .....	39
<b>Quadro 6</b> — Interações entre os derivados aminoacídicos eleitos e os resíduos de aminoácidos chave.....	45
<b>Quadro 7</b> — Interações entre as benzoiltiouréias eleitas e os resíduos de aminoácidos chave.....	56
<b>Quadro 8</b> — Interações entre as tio-hidantoínas eleitas e os resíduos de aminoácidos chave.....	73



## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

A — Resíduo de aminoácido alanina;  
Å — Angstrom;  
ASP — *Astex Statistical Potential*;  
Bn — Benzila;  
CE<sub>50</sub> — Concentração efetiva;  
CI<sub>50</sub> — Concentração inibitória;  
D — Resíduo de aminoácido ácido aspártico;  
Da — Dalton;  
DSV — *Discovery Studio Visualizer*;  
F — Resíduo de aminoácido fenilalanina;  
FDA — *Food and Drug Administration*;  
G — Resíduo de aminoácido glicina;  
Gold — *Genetic Optimisation for Ligand Docking*;  
H. — Gênero *Homo*;  
I — Resíduo de aminoácido isoleucina;  
iPr — Isopropila;  
K — Resíduo de aminoácido lisina;  
L. — Gênero *Leishmania*;  
M — Resíduo de aminoácido metionina ou concentração molar;  
Me — Metila;  
MMFF — *Merck Molecular Force Field*;  
MOPAC — *Molecular Orbital PACKage*;  
N — Resíduo de aminoácido asparagina;  
OMS — Organização Mundial da Saúde;  
PACL — Preferencial de Aminoácidos de Cadeia Lateral Ramificada;  
PANP — Preferencial de Aminoácidos Neutros e Pequenos;  
PDB — *Protein Data Bank*;  
Q — Resíduo de aminoácido glutamina;  
RMN — Ressonância Magnética Nuclear;  
RMSD — *Root Mean Square Deviation*;  
S — Resíduo de aminoácido serina;  
SBDD — *Structure-Based Drug Design*;  
sin. — Sinônimo;  
SUS — Sistema Único de Saúde;  
T. — Gênero *Trypanosoma*;  
T — Resíduo de aminoácido treonina;  
UEL — Universidade Estadual de Londrina;  
V — Resíduo de aminoácido valina;  
var. — Variação;  
VIH — Vírus da imunodeficiência humana;  
Y — Resíduo de aminoácido tirosina.

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>18</b>
1.1 Leishmaniose: Aspectos gerais sobre a doença .....	18
1.2 A proteassoma como alvo terapêutico no tratamento da leishmaniose visceral .	24
1.3 Alguns conceitos básicos relacionados à ancoragem molecular de ligantes em biomacromoléculas .....	31
<b>2. OBJETIVOS GERAIS E ESPECÍFICOS</b> .....	<b>35</b>
<b>3. METODOLOGIA</b> .....	<b>36</b>
3.1 Estrutura dos ligantes submetidos à ancoragem molecular na proteassoma 20S de <i>L. tarentolae</i> .....	36
3.1.1 Planejamento estrutural de 128 derivados aminoacídicos .....	36
3.1.2 Substâncias de padrão estrutural benzoiltiouréia e tio-hidantoína .....	40
3.2 Validação do modelo computacional da proteassoma 20S de <i>L. tarentolae</i> e ancoragem molecular dos ligantes.....	41
3.2.1 Otimização da estrutura tridimensional da biomacromolécula .....	41
3.2.2 Construção e otimização estrutural in silico de <b>20</b> .....	41
3.2.3 Redocagem de <b>20</b> na estrutura tridimensional 6QM7 .....	42
3.2.3 Ancoragem molecular dos derivados aminoacídicos, benzoiltiouréias e tio-hidantoínas na estrutura 6QM7 .....	43
3.2.4 Especificações do dispositivo empregado nos cálculos computacionais .....	43
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>44</b>
4.1 Validação do modelo computacional.....	44
4.2 Análise do modo de ligação das melhores poses eleitas de cada um dos três conjuntos de ligantes triados.....	45
4.2.1 As 10 melhores poses eleitas de ligantes com padrão estrutural aminoacídico .....	45
4.2.2 As 10 melhores poses eleitas de ligantes com padrão estrutural benzoiltiouréia .....	56
4.2.3 As 10 melhores poses eleitas de ligantes com padrão estrutural tio-hidantoína .....	65
<b>5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS</b> .....	<b>75</b>
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>76</b>

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Leishmaniose: Aspectos gerais sobre a doença

A leishmaniose é uma doença transmitida por vetor e é causada por parasitos, os quais são digenéticos, flagelados e pertencentes ao gênero *Leishmania*. Os hospedeiros vertebrados, dos referidos parasitos, abrangem uma ampla variedade de mamíferos, incluindo os canídeos, hiracoides, marsupiais, roedores e os seres humanos. Atualmente, 18 espécies e 3 subgêneros de parasitos são patógenos aos seres humanos, os quais estão dispostos no **Quadro 1** (AKHOUNDI et al., 2016; LAINSON; SHAW, 1987; STEVERDING, 2017).

Espécie	Subgênero
<i>L. aethiopica</i>	Leishmania
<i>L. amazonensis</i>	
<i>L. braziliensis</i>	
<i>L. donovani</i>	
<i>L. guyanensis</i>	
<i>L. infantum</i> (sin. <i>L. chagasi</i> )	
<i>L. lainsoni</i>	Mundinia
<i>L. lindenbergi</i>	
<i>L. major</i>	
<i>L. martiniquensis</i>	
<i>L. mexicana</i> (sin. <i>L. pifanoi</i> )	
<i>L. naiffi</i>	
<i>L. panamensis</i>	Viannia
<i>L. peruviana</i>	
<i>L. shawi</i>	
<i>L. tropica</i>	
<i>L. venezuelensis</i>	
<i>L. waltoni</i>	

**Quadro 1** — Espécies e subgêneros de parasitos causadores da leishmaniose nos seres humanos  
**Fonte:** AKHOUNDI et al., 2016; STEVERDING, 2017.

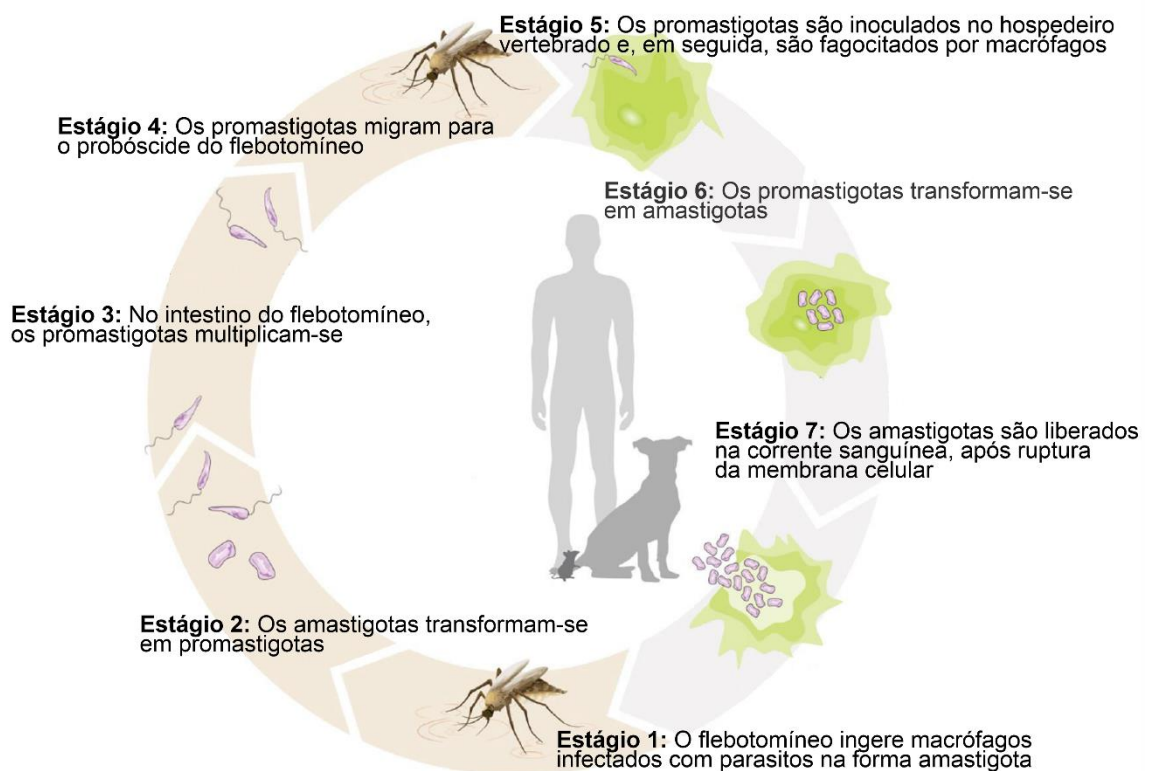
O vetor da leishmaniose é um flebotomíneo. Hoje em dia, mais de 800 espécies são conhecidas e, entre elas, aproximadamente 464 são encontradas no novo mundo e 375 no velho mundo (GALATI, 2003; SECCOMBE; READY; HUDDLESTON, 1993).

A espécie mais comum pertence ao gênero *Phlebotomus*, no velho mundo, e *Lutzomyia*, no novo mundo (ANVERSA et al., 2018). O flebotomíneo habita regiões úmidas e ricas em matéria orgânica, pois, assim como o sangue dos mamíferos, ela fornece os nutrientes necessários para o desenvolvimento do referido inseto. O ciclo de vida do vetor ocorre em, aproximadamente, 30 dias e abrange 3 estágios principais, a saber: ovo, larva e forma alada. No Brasil, *Lutzomyia longipalpis* é a principal espécie de vetor da doença, a qual é popularmente chamada de asa-dura, birigui, cangalha, mosquito-palha ou tatuquira, a depender da região geográfica. A referida espécie possui cor amarela ou palha e, em repouso, permanece com as asas eretas e semiabertas (BRASIL, 2020; ROGERS; CHANCE; BATES, 2002; ZORZETTO, 2008).

O ciclo de vida do parasito do gênero *Leishmania*, o qual é ilustrado pela **Figura 1**, envolve dois hospedeiros diferentes: o flebotomíneo (vetor) e o mamífero. O flebotomíneo contrai os parasitos durante a hematofagia do sangue de hospedeiros vertebrados infectados — nos centros urbanos, *Canis lupus familiaris* é o principal reservatório doméstico do parasito (MORENO; ALVAR, 2002) — ingerindo macrófagos infectados com amastigotas (Estágio 1, **Figura 1**). No intestino do flebotomíneo, os amastigotas transformam-se em vários intermediários morfológicos até, por fim, na forma flagelada, denominada promastigota (ROGERS; CHANCE; BATES, 2002). Os promastigotas replicam-se, por divisão binária, e, posteriormente, migram do intestino para o probóscide do flebotomíneo. Então, em uma outra ocasião de hematofagia, os promastigotas são inoculados nos hospedeiros vertebrados (Estágios 2, 3 e 4) (WALKER et al., 2013). Após a inoculação dos parasitos em um ser humano não infectado (Estágio 5), o sistema imunológico recruta, por meio de citocinas e quimiocinas secretadas no local da picada (BIANCHI, 2007; KAYE; SCOTT, 2011), macrófagos (BRITTINGHAM, 1995) e neutrófilos, os quais iniciam o processo de fagocitose dos parasitos invasores (Estágio 6). Todavia, os parasitos conseguem desativar mecanismos importantes de fagocitose e se hospedam nas referidas células (KANE; MOSSER, 2000; LODGE; DIALLO; DESCOTEAUX, 2006; PETERS et al., 2008; REMALEY et al., 1984; VINET et al., 2009). Especificamente no interior dos macrófagos, em uma organela denominada vacúolo parasitofóro, os promastigotas transformam-se em amastigotas, multiplicam-se e, devido à sobrecarga de parasitos, a ruptura da membrana celular é ocasionada, liberando-os no meio extracelular, os quais infectam outros macrófagos e acessam diferentes áreas do corpo

humano (Estágios 6 e 7), reiniciando o ciclo de vida supracitado (ANTOINE et al., 1990; ANTOINE et al., 1998; CDC, 2020).

A partir do estágio 7 (**Figura 1**), o diagnóstico da doença é possível. Os testes diagnósticos da leishmaniose incluem a visualização direta dos amastigotas por microscopia, reação de cadeia polimerase, testes sorológicos e de detecção de antígenos (CHAPPUIS, 2007; MONDAL; BHATTACHARYA; ALI, 2010; ODIWUOR et al., 2011).



**Figura 1** — O ciclo de vida do parasito do gênero *Leishmania*  
**Fonte:** adaptado de BLANCO; NASCIMENTO-JÚNIOR, 2020.

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), o ser humano pode apresentar uma das três manifestações clínicas principais da leishmaniose, a saber: a cutânea (também é conhecida como tegumentar), a mucocutânea e a visceral (também é chamada de calazar); a depender da espécie de parasito (CDC, 2020; WHO, 2020).

A leishmaniose cutânea é a mais comum e causa lesões, principalmente úlceras, na pele. Após a autocura das úlceras, processo que dura de 8 meses até 2 anos, cicatrizes permanentes são formadas. Em torno de 95% dos casos ocorrem nas Américas, Ásia Central, Bacia do Mediterrâneo e Oriente Médio. Em 2019, mais de

87% dos novos casos ocorreram nos seguintes países: Afeganistão, Argélia, Brasil, Colômbia, Irã, Iraque, Líbia, Paquistão, Síria e Tunísia. Estima-se que entre 600 mil a 1 milhão de novos casos ocorram no mundo, anualmente (MOHEBALI; NADIM; KHAMESIPOUR, 2019; WHO, 2020).

A manifestação clínica mucocutânea leva à destruição parcial ou total das mucosas da boca, garganta e nariz. Mais de 90% dos casos ocorrem na Bolívia, Brasil, Etiópia e Peru (WHO, 2020).

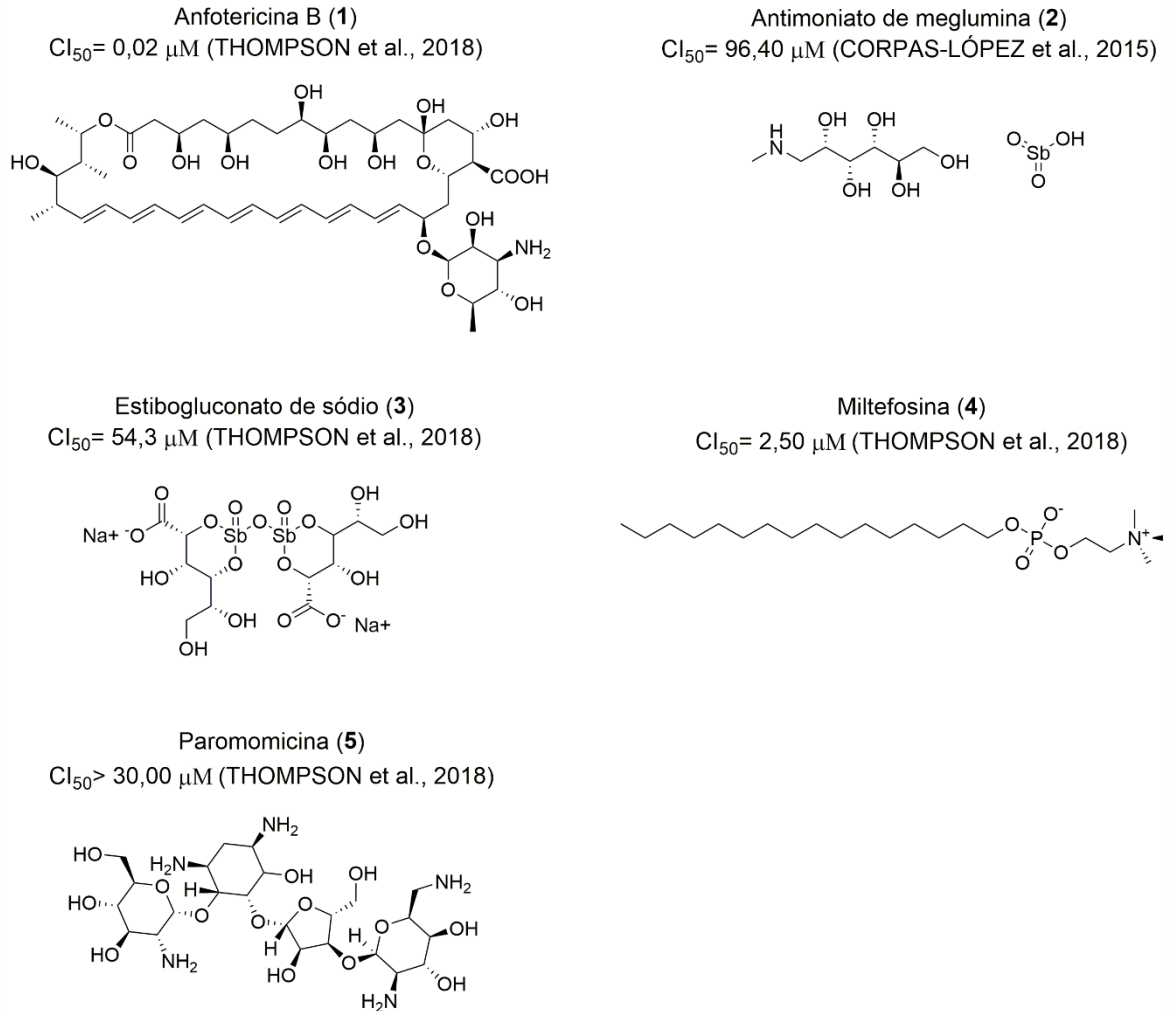
A leishmaniose visceral é a manifestação clínica mais severa e, se não tratada, é fatal em mais de 95% dos casos. Ela é caracterizada por anemia, aumento do baço e do fígado, crises irregulares de febre e perda de peso. A maioria dos casos ocorre na África Oriental, Brasil e Índia. É estimado que entre 50 mil a 90 mil novos casos ocorram anualmente em todo o mundo. Em 2019, mais de 95% dos novos casos registrados aconteceram nos seguintes países: Brasil, Eritreia, Etiópia, Índia, Iraque, Quênia, Nepal, Somália, Sudão do Sul e Sudão (WHO, 2020). Os agentes etiológicos da leishmaniose visceral são parasitos das espécies *L. donovani* e *L. infantum* (WYLLIE et al., 2019).

Particularmente no Brasil, de acordo com dados epidemiológicos disponibilizados pelo Ministério da Saúde, 1933 casos de leishmaniose visceral e 165 óbitos causados pela doença foram registrados em 2020. Ademais, no referido ano, a região nordeste, em comparação com as demais regiões, apresentou o maior número de casos registrados e óbitos, 959 e 107, respectivamente. (BRASIL, 2020).

Assim como outras doenças tropicais negligenciadas, a leishmaniose afeta, principalmente, populações que habitam regiões empobrecidas de países em desenvolvimento. As condições de mercado, nos referidos países, desfavorecem investimentos oriundos de indústrias farmacêuticas, com fins lucrativos, em pesquisa e desenvolvimento de novas alternativas medicamentosas para o tratamento dessa e outras doenças tropicais negligenciadas. Assim, a farmacopeia para tais doenças é pequena e ficou inalterada desde meados do século XX (HOTEZ et al., 2006; SUNYOTO; POTET; BOELAERT, 2018; WHO, 2020).

No que se refere ao tratamento da leishmaniose visceral, atualmente há 5 opções de fármacos disponíveis, a saber: Anfotericina B (1); Antimoniato de meglumina (2); Estibogluconato de sódio (3); Miltefosina (4) e Paromomicina (5), cujas fórmulas estruturais são demonstradas pela **Figura 2**. Os fármacos supramencionados apresentam sérias desvantagens em termos de segurança, longa

duração de tratamento em um regime de monoterapia, a maioria é administrada via parenteral e possui um mecanismo de ação desconhecido (DNDi, 2020).



**Figura 2** — Fórmula estrutural de fármacos utilizados no tratamento da leishmaniose visceral. Os valores de  $CI_{50}$  são baseados na espécie *L. donovani*. Imagem gerada no programa ChemDraw, versão 12.0.2.1076

**Fonte:** elaborado pelo autor.

Em 1955, **1** foi isolado a partir da bactéria *Streptomyces nodosus* devido a sua atividade fungicida (GOLD et al., 1956) e, subsequentemente, ele foi reposicionado no tratamento da leishmaniose visceral, onde o primeiro caso de sucesso foi registrado no Brasil, em 1963 (PRATA, 1963). Apesar da taxa de eficácia clínica acima de 97% alcançada na redução da carga parasitária, em todas as regiões geográficas (GRIENSVEN; DIRO, 2012), efeitos adversos, abrangendo hipocalcemia, miocardite, nefrotoxicidade e reações infusionais exigem o monitoramento hospitalar do paciente durante todo o período de tratamento da doença com o referido fármaco, aumentando o custo da terapia. Objetivando a minimização dos efeitos colaterais

supramencionados, uma formulação lipídica de **1**, denominada anfotericina B lipossomal, foi desenvolvida, tal formulação atenuou a nefrotoxicidade (CHAKRAVARTY; SUNDAR, 2019).

O uso de sais de antimônio pentavalente, tais como **2** e **3**, no tratamento da leishmaniose visceral, iniciou-se em 1940 (ALVAR; CROFT; OLLIARO, 2006). Eles foram o tratamento padrão da doença em várias partes do mundo, no entanto, em Bihar, localizado no subcontinente indiano, tornaram-se ineficazes devido ao desenvolvimento de resistência nos parasitos (RIJAL et al., 2003; SUNDAR et al., 2000), rebaixando essa classe da primeira linha de tratamento na referida região. Os efeitos colaterais associados ao uso desses fármacos incluem cardiotoxicidade e pancreatite. Eles podem ser administrados via intravenosa ou intramuscular (GRIENSVEN; DIRO, 2012).

Originalmente, **4** foi planejado como um fármaco com atividade antitumoral (HILGARD et al., 1988; UNGER et al., 1989), posteriormente, foi descoberto que ele também exibia atividade leishmanicida (CROFT et al., 1987; CROFT; SNOWDON; YARDLEY, 1996) e, em 2002, na Índia, o uso do referido fármaco foi aprovado no tratamento da leishmaniose visceral, sendo o primeiro administrado via oral. Apesar do avanço na melhoria em termos de administração, o uso de **4** está correlacionado a severos efeitos colaterais, entre eles, os principais são gastrointestinais e, ocasionalmente, hepatotoxicidade e nefrotoxicidade (NAGLE et al., 2014). Além disso, o potencial teratogênico é outra limitação do emprego de **4**, no tratamento da leishmaniose visceral, em vários países (GRIENSVEN, 2012).

Em 2006, um antibiótico aminoglicosídeo de amplo espectro, isolado na década de 1950 da espécie *Streptomyces rimosus* var. *paromomycinus*, foi introduzido no tratamento da leishmaniose visceral, exibindo, como principal vantagem, um baixo custo (NAGLE et al., 2014; WIWANITKIT, 2012). **5** demonstrou ser muito eficaz, porém, o uso desse fármaco pode ocasionar efeitos tóxicos nos rins e ouvidos (DNDi, 2020). Ademais, em uma monoterapia, **5** possui um grande potencial para desenvolver resistência nos parasitos.

Entre os fármacos supracitados, apenas **1**, em sua formulação lipídica, e **4** foram aprovados pela agência norte-americana reguladora de fármacos (FDA, na sigla em inglês para *Food and Drug Administration*) para serem empregados no tratamento da leishmaniose visceral (BERMAN, 1999; FDA, 2014). No Brasil, o tratamento da



leishmaniose visceral é gratuito, disponibilizado na rede de serviços do Sistema Único de Saúde (SUS) e baseado no emprego dos fármacos **1** e **2** (BRASIL, 2020).

Além dos desafios inerentes aos próprios fármacos, as respostas para o tratamento da leishmaniose visceral variam de acordo com a região geográfica, conseqüentemente, os tratamentos recomendados também diferem, como pode ser constatado no **Quadro 2**.

Região	Fármacos Utilizados
África	Combinação de <b>3</b> com <b>5</b>
Ásia	<u>Primeira opção:</u> <b>1</b> <u>Segundas opções:</u> combinação de <b>1</b> com <b>5</b> ; <b>1</b> com <b>4</b> ; <b>4</b> com <b>5</b>
América latina	<b>1</b> e <b>2</b>

**Quadro 2** — Tratamentos da leishmaniose visceral nas regiões endêmicas da África, Ásia e América Latina

**Fonte:** What are the current drugs for visceral leishmaniasis?, DNDi, 2021; Ministério da Saúde do Brasil: Situação epidemiológica da leishmaniose visceral (BRASIL, 2020).

Adicionalmente, a coinfeção pelo vírus da imunodeficiência humana (VIH) pode aumentar a severidade da leishmaniose visceral, tornando os tratamentos usuais ineficazes e requerendo novas combinações de fármacos, acompanhamento hospitalar do paciente e maior duração de tratamento (DNDi, 2020).

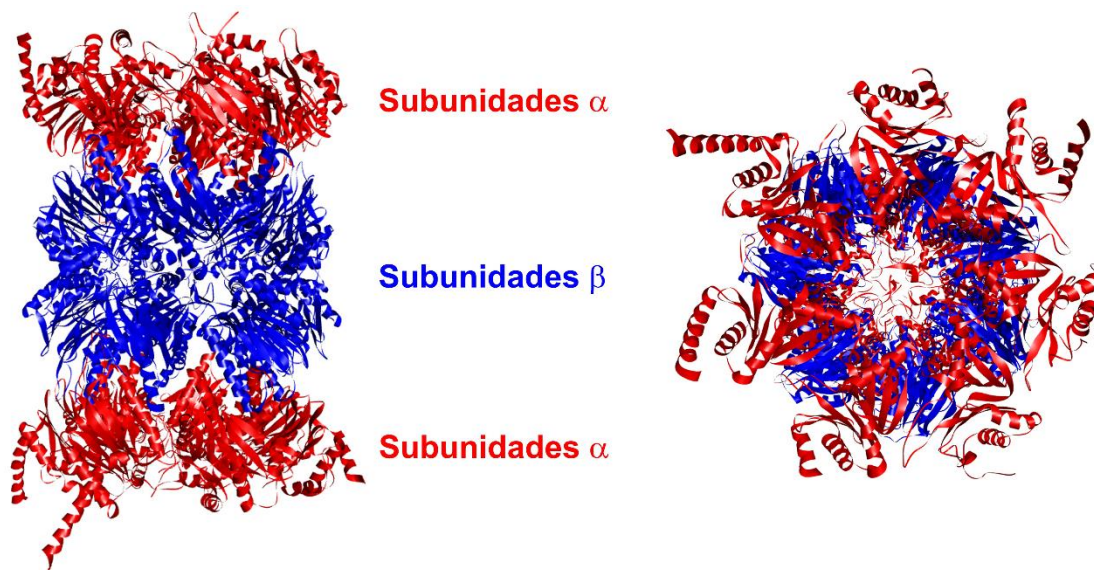
Portanto, é veemente a demanda por novos fármacos para o tratamento da leishmaniose visceral, que sejam acessíveis por populações financeiramente carentes, atuem em um alvo terapêutico validado e exibam um perfil seguro.

## 1.2 A proteassoma como alvo terapêutico no tratamento da leishmaniose visceral

A proteassoma 26S é um grande complexo proteico que possui massa molecular maior do que 2 MDa e é altamente conservada entre os eucariotos (KIM; YU; CHENG, 2011). Assim como toda enzima proteolítica, a principal função dela é a degradação intracelular de proteínas por meio da clivagem das ligações peptídicas (BEYNON; BOND, 2001), regulando diferentes processos biológicos, tais como: apoptose; controle do ciclo celular; regulação imunológica; sinalização e transcrição (ADAMS, 2001; DIETRICH et al., 1996, THIBAudeau; SMITH, 2019).

A estrutura da proteassoma 26S dos eucariotos é composta por duas partes, a saber: a proteassoma 20S e um componente regulatório (também é denominado partícula regulatória ou PA700) (EYTAN et al., 1989; HOUGH; PRATT; RECHSTEINER, 1987). A proteassoma 20S possui forma cilíndrica, massa molecular igual a, aproximadamente, 700 kDa, dimensões de, aproximadamente, 160 Å de comprimento e 120 Å de diâmetro, sendo formada pelo empacotamento axial de quatro anéis heptaméricos de proteínas, dois anéis compostos exclusivamente de subunidades  $\alpha$  (em vermelho, **Figura 3**), nas extremidades, e dois anéis compostos exclusivamente de subunidades  $\beta$  (em azul), dispostos entre os anéis de subunidades  $\alpha$ , formando uma estrutura de estequiometria  $\alpha_{1-7}\beta_{1-7}\beta_{1-7}\alpha_{1-7}$  (BORISSENKO; GROLL, 2007; HARRIS, 1968; HEGERL et al., 1991). A partícula PA700 veda cada uma das extremidades da proteassoma 20S, regulando a entrada, de forma linear, do substrato (proteínas danificadas, mal enoveladas ou oxidadas) na região proteolítica, a saída dos produtos da proteólise e também realiza a liberação das ubiquitinas, as quais sinalizam o substrato (HERSHKO et al., 1983; THIBAudeau; SMITH, 2019).

A proteassoma 20S dos eucariotos contem 3 subunidades proteolíticas ativas por anel  $\beta$ , a saber: as subunidades  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  e  $\beta_5$ . Há forte evidência de que as subunidades proteolíticas ativas possuem um resíduo catalítico de treonina amino-terminal que atua como nucleófilo no processo catalítico, categorizando a proteassoma na classe das proteases de treonina (SEEMÜLLER et al., 1995). Atualmente, 5 atividades catalíticas diferentes da proteassoma são conhecidas, a saber: a semelhante à caspase, a semelhante à quimotripsina; a preferencial de aminoácidos de cadeia lateral ramificada (PACL), a preferencial de aminoácidos neutros e pequenos (PANP) e a semelhante à tripsina, conferindo à proteassoma a capacidade de clivar ligações peptídicas de uma ampla combinação de resíduos de aminoácidos (ARENDET; HOCHSTRASSER, 1997; ORLOWSKI; CARDOZO; MICHAUD, 1993). A subunidade  $\beta_1$  exibe, preferencialmente, atividade semelhante à caspase e, de acordo com estudos de mutagênese, também exibe atividade, limitada, do tipo PAOL (DICK et al., 1998; GROLL et al., 1999; HILT; WOLF, 1996). A subunidade  $\beta_2$  apresenta atividade semelhante à tripsina. A subunidade  $\beta_5$  exibe, preferencialmente, atividade semelhante à quimotripsina e, adicionalmente, de acordo com estudos de mutagênese, também apresenta atividades PAOL e PANP (BORISSENKO; GROLL, 2007).

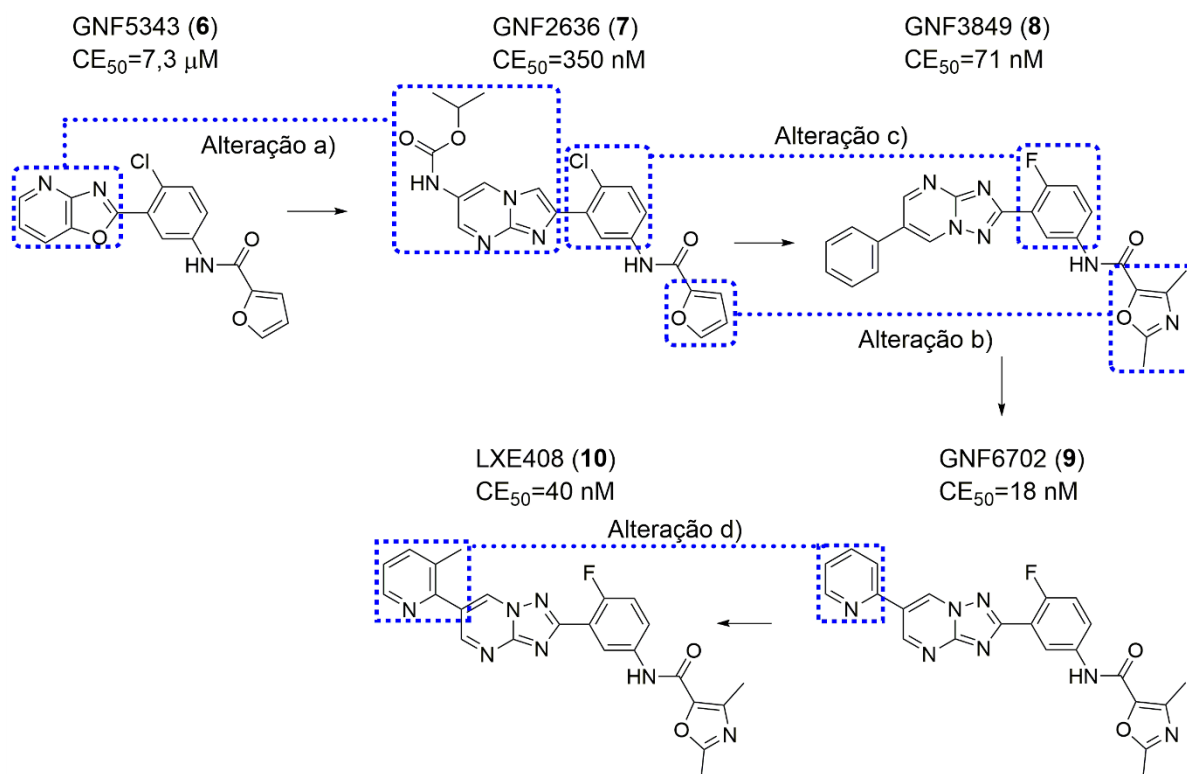


**Figura 3** — Estrutura da proteassoma 20S de *L. tanrentolae* (PDB ID 6QM7). Imagem gerada com os programas DSV e Corel PHOTO-PAINT, versões 21.1.0.20298 e 22.0.0.412, respectivamente  
**Fonte:** elaborado pelo autor.

Em 2016, Khare e colaboradores reportaram a descoberta de um seletivo inibidor da proteassoma de parasitos da espécie *L. donovani*, denominado GNF6702 (9) (KHARE et al., 2016). O referido inibidor foi o resultado da otimização de um *hit* (6), o qual foi identificado através da triagem de 3 milhões de compostos em modelos de inibição da proliferação de três espécies diferentes de cinetoplastídeos, a saber: *L. donovani*, *T. cruzi* e *T. brucei*.

A otimização de 6 envolveu o planejamento e a síntese de aproximadamente 3 mil compostos, objetivando a melhoria da biodisponibilidade e da potência na inibição do crescimento de parasitos de *L. donovani* dentro de macrófagos. A modificação estrutural mais importante foi a substituição do centro azobenzoxázólico por núcleos de imidazo e triazolopirimidina substituídos na posição número 6 (Alteração a), **Figura 4**), a qual foi acompanhada por um aumento de aproximadamente 20 vezes da potência contra o crescimento dos parasitos em comparação ao *hit*, resultando na estrutura de 7. O risco de toxicidade associado à metabolização do grupo furano, do composto 7, foi reduzido pela substituição do referido grupo por uma dimetiloxazola (Alteração b)) e a alteração da clorofenila por fluorofenila (Alteração c)) melhorou a seletividade em relação a inibição do crescimento de células de mamífero, formando a estrutura de 8. Outras substituições, especificamente na posição número 6 do núcleo estrutural bicíclico, contribuíram para um aumento total de cerca de 400 vezes

da potência contra parasitos da espécie *L. donovani*, em comparação com o *hit*, resultando na estrutura de **9**. Estudos de mutagênese demonstraram que **9** inibe, seletivamente, a atividade semelhante à quimotripsina da proteassoma dos parasitos (KHARE et al., 2016).



**Figura 4** — Esquematização das mudanças estruturais iniciadas em **6** que resultaram em **10**. Os valores de CE<sub>50</sub> são baseados na espécie *L. donovani*. Imagem gerada no programa ChemDraw, versão 18.1.0.535

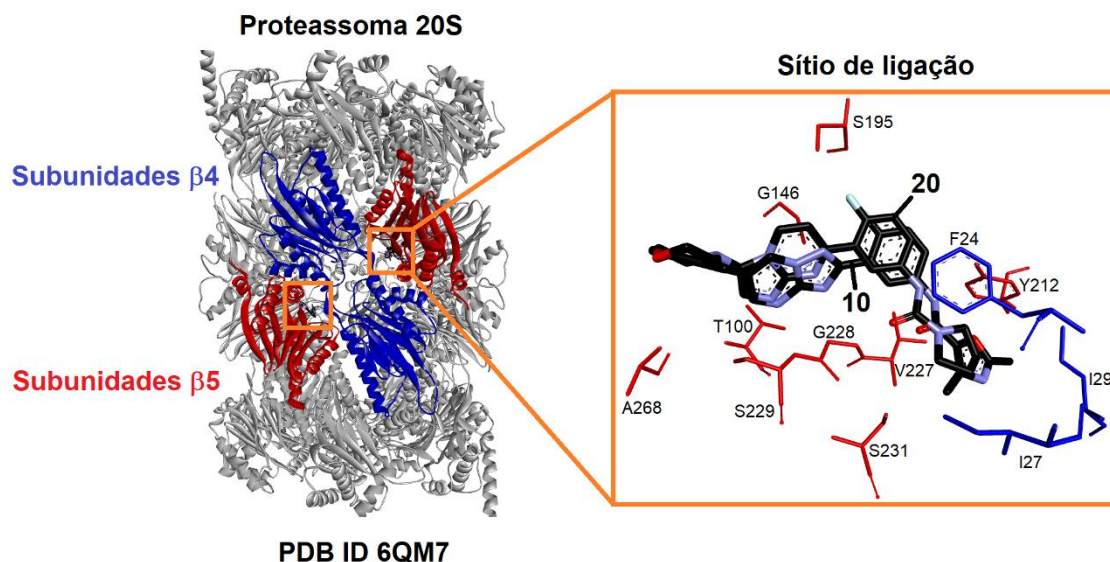
**Fonte:** elaborado pelo autor.

No entanto, apesar dos promissores resultados obtidos, a baixa absorção oral, limitada pela reduzida solubilidade de **9**, dificultou o progresso para ensaios clínicos. Tal limitação poderia ser superada por meio do emprego de formulações especializadas, como, por exemplo, nanosuspensões e dispersão sólida, mas encareceria o custo do tratamento, prejudicando o uso por populações financeiramente carentes (NAGLE et al., 2020).

Então, visando a melhoria da solubilidade de **9**, uma nova modificação estrutural foi realizada, a substituição do átomo de hidrogênio da posição 3 da subunidade piridínica por grupos mais volumosos (cloro, fluorometila, hidroximetila, metila e metoxila) forçando-a para fora do plano em relação ao núcleo estrutural bicíclico, diminuindo a energia de empacotamento do cristal e, conseqüentemente,

aumentando a solubilidade do referido composto químico (Alteração d), **Figura 4**). O resultado foi um promissor candidato a fármaco para o tratamento da leishmaniose visceral, denominado LXE408 (**10**), o qual exibiu excelente eficácia em modelos animais da doença, um perfil seguro e um curto período de tratamento quando dosado oralmente (NAGLE et al., 2020).

A obtenção da estrutura tridimensional de **10** complexado com a proteassoma 20S de *L. tarentolae*, por meio da técnica de criomicroscopia eletrônica, demonstrou que o sítio de ligação do referido ligante está situado entre as subunidades  $\beta 4$  e  $\beta 5$ , em uma região proximal ao resíduo catalítico de T100. Coincidentemente, é no mesmo local de um análogo estrutural denominado GSK3494245 (**20**), como é representado através da **Figura 5** (NAGLE et al., 2020; WYLLIE et al., 2019).



**Figura 5** — Sobreposição entre **10** e **20** no sítio de ligação da proteassoma 20S de *L. tarentolae* (PDB ID 6TCZ e 6QM7, respectivamente). Os átomos de carbono, flúor, nitrogênio e oxigênio dos ligantes estão coloridos em preto, ciano, azul e vermelho, respectivamente. Todos os átomos dos resíduos de aminoácidos das subunidades  $\beta 4$  e  $\beta 5$  estão coloridos em azul e vermelho, respectivamente. Os átomos de hidrogênio foram omitidos para melhor clareza. Imagem gerada com os programas DSV e Corel PHOTO-PAINT, versões 21.1.0.20298 e 22.0.0.412, respectivamente  
**Fonte:** elaborado pelo autor.

As subunidades  $\beta 4$  e  $\beta 5$  das espécies *L. tarentolae* e *L. donovani* compartilham um grau de identidade sequencial de 95% e 98%, respectivamente. Os 26 resíduos de aminoácidos do sítio de ligação que estão envolvidos no reconhecimento molecular de **20** são completamente conservados entre as duas espécies, segundo Wyllie e colaboradores. Ademais, a potência de **20** contra parasitos da espécie *L. tarentolae* ( $CE_{50} = 40$  nM) foi comparável a alcançada contra a espécie *L. donovani* ( $CE_{50} = 14$

nM). Esses dados garantiram confiança na obtenção da estrutura tridimensional de **20** complexado com a proteassoma referente à espécie não patogênica, *L. tarentolae*.

Entre os resíduos presentes no sítio de ligação, da proteassoma dos parasitos, 9 são diferentes da estrutura humana, como é possível constatar no **Quadro 3**. A maioria dos resíduos diferentes compõem um bolsão hidrofóbico, os quais estão destacados em negrito, onde estão inseridas as subunidades (pirrolidina)-1-carboxamida e, parcialmente, a fluorofenila de **20**. Na estrutura humana, o referido bolsão hidrofóbico é mais aberto, raso e exposto ao solvente, perdendo o caráter hidrofóbico, em comparação com as estruturas da enzima dos parasitos, o que pode ser a base molecular para a seletividade moderada de **20** frente à enzima humana (WYLLIE et al., 2019).

Espécie	Resíduos de aminoácidos								
<i>L. tarentolae</i>	<b>F24</b>	<b>Y25</b>	<b>I27</b>	<b>K28</b>	<b>I29</b>	S120	T121	D215	A268
<i>L. donovani</i>	<b>F24</b>	<b>Y25</b>	<b>I27</b>	<b>K28</b>	<b>I29</b>	S120	T121	D215	A268
<i>H. sapiens</i>	<b>S24</b>	<b>N25</b>	<b>V27</b>	<b>Q28</b>	<b>M29</b>	T120	A121	S215	Y268

**Quadro 3** — Resíduos de aminoácidos da proteassoma 20S, das espécies *L. tarentolae* e *L. donovani*, os quais compõem o sítio de ligação de **20**, que são diferentes da referida enzima da espécie *H. sapiens*. Os resíduos que compõem o bolsão hidrofóbico do sítio de ligação estão destacados em negrito.

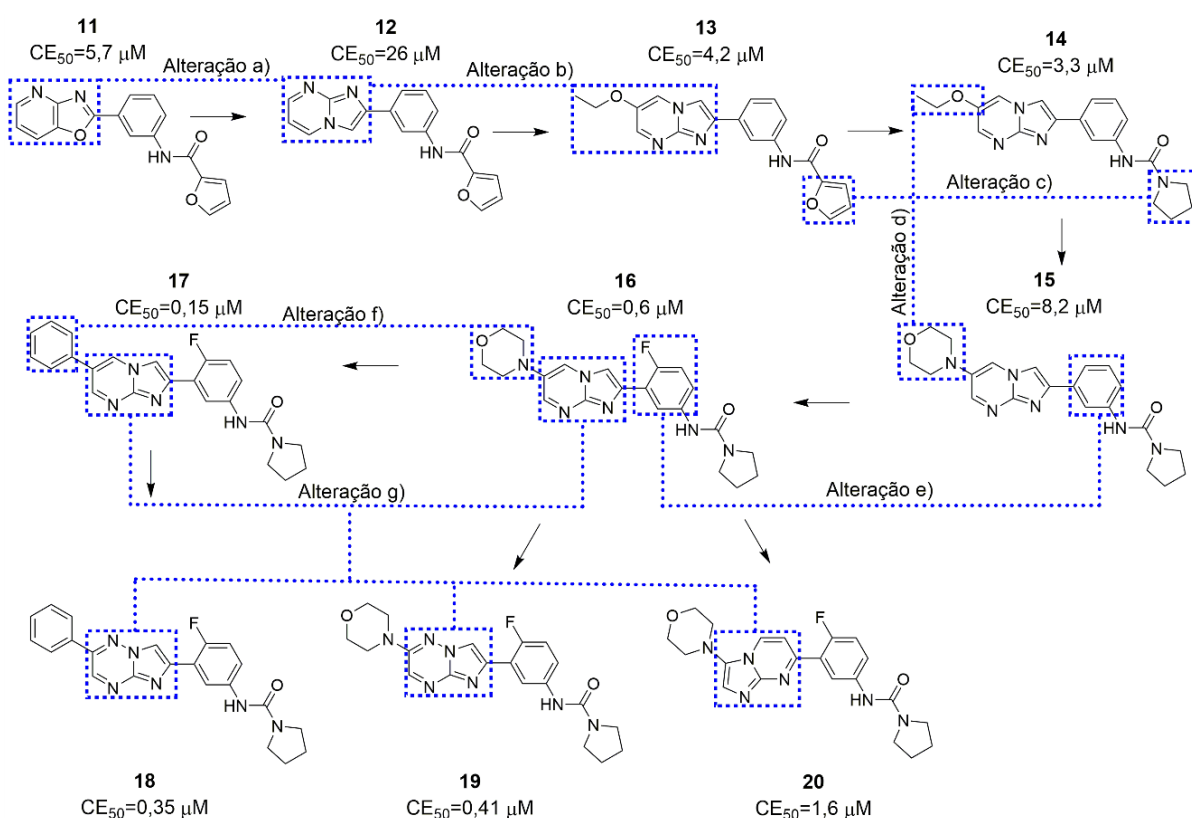
**Fonte:** WYLLIE et al., 2019.

**20** foi descoberto por um grupo de pesquisadores da Universidade de Dundee, através da otimização estrutural de um *hit* (**11**, **Figura 6**), o qual foi obtido em uma triagem fenotípica de uma biblioteca de 15659 compostos com atividade contra parasitos da espécie *T. cruzi* (WYLLIE et al., 2019).

Inicialmente, os pesquisadores alteraram o núcleo estrutural bicíclico de **11**, formando **12** (Alteração a), **Figura 6**), o qual manteve atividade contra *T. cruzi*. Posteriormente, ambos foram triados contra parasitos da espécie *L. donovani* e, como resultado, **12** demonstrou ter melhor solubilidade cinética em comparação com **11** e, portanto, ele foi eleito pelos pesquisadores para posteriores otimizações estruturais (WYLLIE et al., 2019).

A substituição do átomo de hidrogênio da posição 6 do anel de pirimidina, da estrutura de **12**, por um grupo etoxila (Alteração b), **Figura 6**), melhorou a estabilidade metabólica in vitro e gerou o composto **13**. Como a metabolização do grupo furano pode produzir intermediários altamente reativos e tóxicos, os pesquisadores

substituíram o grupo (furano)-2-carboxamida, do composto **13**, por um grupo (pirrolidina)-1-carboxamida (Alteração c)), originando a estrutura de **14**. A alteração do substituinte 6-etoxila por uma morfolina (Alteração d)) resultou em **15**, o qual apresentou boa estabilidade metabólica e melhor solubilidade. A adição de flúor na quarta posição do anel fenila (Alteração e)) aumentou em mais de 10 vezes a potência contra a espécie *L. donovani* e gerou **16**. Em seguida, a potência foi levemente aumentada com a substituição da morfolina por uma fenila (Alteração f)), criando a estrutura de **17**. O composto **16** demonstrou ser suscetível à genotoxicidade e o **17** exibiu baixa solubilidade. A estratégia chave empregada pelos pesquisadores para enfrentar tais limitações foi substituir o núcleo estrutural bicíclico de ambos (Alteração g)), envolvendo a variação da posição, do número de heteroátomos e a troca das posições dos anéis de 6 e 5 membros. Como resultado, 3 compostos foram formados, a saber: **18**, **19** e **20** (WYLLIE et al., 2019).



**Figura 6** — Evolução das séries de **11** até **20**. Os valores de  $CE_{50}$  são baseados contra amastigotas de *L. donovani* situados dentro de macrófagos. Imagem gerada no programa ChemDraw, versão 18.1.0.535

**Fonte:** elaborado pelo autor.

O composto químico **20** apresentou melhor solubilidade em meio de dissolução no intestino delgado, boa estabilidade metabólica in vitro, seletividade sobre células de mamíferos e resultados negativos em testes mutagênicos em comparação com os análogos estruturais **18** e **19**, portanto, Wyllie e colaboradores o elegeram para caracterizações de perfil mais detalhadas, as quais demonstraram que ele detém propriedades farmacocinéticas balanceadas, perfil seguro e boa seletividade em relação à enzima humana (WYLLIE et al., 2019).

Considerando os exemplos de **10** e **20**, conclui-se que a busca por novos inibidores da proteassoma 20S de parasitos da espécie *L. donovani* mostra-se uma promissora estratégia para o descobrimento de potenciais candidatos a fármacos para o tratamento da leishmaniose visceral.

### **1.3 Alguns conceitos básicos relacionados à ancoragem molecular de ligantes em biomacromoléculas**

A descoberta de compostos *hits* e líderes, que interajam com alvos terapêuticos específicos, é de importância central nos estágios iniciais da descoberta de novos candidatos a fármacos. Isso é convencionalmente realizado por triagem de alto desempenho, um método prático empregado na investigação de um grande número de compostos sintéticos em ensaios in vitro miniaturizados, visando a identificação de compostos capazes de modular um determinado alvo biológico de interesse. Contudo, avanços na área de bioinformática e biologia estrutural abriram espaço para alternativas de triagem in silico, que, em comparação com as baseadas em ensaios in vitro, são mais baratas e rápidas. Nesse contexto, a ancoragem molecular é muito utilizada na triagem virtual de promissores candidatos a fármacos em alvos biológicos específicos (CHENG et al., 2012; PEREIRA; WILLIAMS, 2009).

A ancoragem molecular é uma ferramenta computacional muito importante em campanhas focadas no planejamento de fármacos baseado na estrutura do receptor (SBDD, na sigla em inglês de *Structure-Based Drug Design*). Em tais campanhas, algumas informações da estrutura tridimensional de uma determinada biomacromolécula, como, por exemplo, a topologia do sítio de ligação, fendas, cavidades e distribuição eletrostática, fornecem uma compreensão substancial de aspectos energéticos e espaciais que podem afetar a afinidade entre o ligante e o receptor. A estrutura tridimensional pode ser obtida experimentalmente, por exemplo,



pela técnica de difratometria de raios X, Ressonância Magnética Nuclear (RMN), criomicroscopia eletrônica ou pode ser estimada através de modelagem comparativa. Em seguida, por meio da ancoragem molecular, uma determinada quimioteca pode ser triada em uma região espacial específica da estrutura tridimensional do alvo biológico. (ANDERSON, 2003; CHENG et al., 2012; FERREIRA et al., 2015).

Antes da ancoragem molecular, a estrutura tridimensional do receptor e dos ligantes requerem preparação, como, por exemplo, adição de átomos de hidrogênio à estrutura da biomacromolécula, adequação dos estados de protonação, tautomérico e estereoisométrico dos resíduos de aminoácidos localizados no sítio de ligação e dos ligantes a serem triados. Em seguida, cada composto é ancorado virtualmente no sítio de ligação do receptor por meio de um programa de ancoragem molecular (ANDERSON, 2003; CHENG et al., 2012).

Os programas de ancoragem molecular utilizam algoritmos de busca conformacional que estimam a conformação e orientação espacial de determinado ligante no sítio de ligação do receptor de interesse. Os referidos algoritmos de busca variam os parâmetros estruturais associados aos graus de liberdade torsional, translacional e rotacional do ligante, explorando o panorama energético conformacional referente à formação do complexo ligante-proteína. A referida busca conformacional pode ser realizada por dois métodos distintos: sistemático ou estocástico (FERREIRA et al., 2015).

Os algoritmos de busca conformacional que usam o método sistemático promovem variações graduais nos parâmetros estruturais do ligante e, de forma determinística, obtém a solução final. Uma maneira de aumentar a chance de se atingir um mínimo de energia global na solução final, é a realização de buscas a partir de conformações iniciais distintas do ligante. Além disso, outro problema é o fenômeno chamado de explosão combinatória, o qual é causado pelo aumento exponencial de possíveis combinações à medida que o grau de liberdade da estrutura do ligante aumenta. Os programas de ancoragem molecular superam este problema por meio de um algoritmo de construção incremental que fragmenta a estrutura do ligante. Em seguida, os fragmentos do ligante são ancorados individualmente. Dessa maneira, o algoritmo reduz os graus de liberdade a serem explorados, evitando o referido fenômeno de explosão combinatória (FERREIRA et al., 2015).

Os algoritmos de busca conformacional que empregam o método estocástico criam um conjunto de conformações iniciais distintas de um determinado ligante,

modificando aleatoriamente os parâmetros estruturais dele, assim, eles exploram uma grande área do espaço energético conformacional e aumentam a probabilidade de um mínimo de energia global ser alcançado na solução final. Por exemplo, os algoritmos genéticos, aplicando o método estocástico, codificam todos os parâmetros estruturais iniciais do ligante em um cromossomo. Em seguida, aleatoriamente, eles criam uma população de cromossomos, cobrindo uma ampla área do panorama energético conformacional. Então, cada um deles é avaliado e os que apresentam menores valores de energia são selecionados como modelos para a geração da próxima população, onde as informações estruturais mais favoráveis são transmitidas. Uma limitação dos referidos algoritmos de busca conformacional é o alto custo computacional associado (FERREIRA et al., 2015).

Independentemente do método de busca conformacional empregado, os programas estimam várias poses para um determinado ligante. As funções de pontuação realizam o ranqueamento das poses geradas, com base em fatores físico-químicos, aproximados, envolvidos na interação ligante-receptor, tais como, interações intermoleculares, desolvatação e efeitos entrópicos (FERREIRA et al., 2015; HUANG; GRINTER; ZOU, 2010).

As funções de pontuação são categorizadas em três classes: baseadas em campo de força, empíricas e baseadas em conhecimento. As funções de pontuação baseadas em campo de força consideram parâmetros físicos relacionados à interação atômica, incluindo interações de van der Waals, interações eletrostáticas e forças de ligação, como estiramento, flexão e torção. Os parâmetros podem ser derivados a partir de dados experimentais ou por meio de cálculos ab initio. Alguns desafios relacionados ao uso das referidas funções de pontuação incluem a consideração de efeitos do solvente na ligação do ligante, como, por exemplo, o efeito da desolvatação, a combinação de termos energéticos individuais e o maior tempo despendido nos cálculos ab initio (FERREIRA et al., 2015; HUANG; GRINTER; ZOU, 2010).

A segunda classe de funções de pontuação, as empíricas, ajustam os coeficientes dos diferentes termos energéticos, por exemplo, van der Waals, eletrostáticos, ligação de hidrogênio, desolvatação, entropia, hidrofobicidade, e etc, através do desenvolvimento de um modelo estatístico, o qual envolve análise, por regressão linear múltipla, de dados conhecidos de afinidade de ligação de um conjunto de complexos ligante-proteína de estrutura tridimensional disponível. Dessa maneira, os termos energéticos assumem uma forma mais simples, em comparação com os

associados com funções de pontuação baseadas em campo de força, tornando os cálculos de pontuação mais rápidos. No entanto, as referidas funções de pontuação ficam totalmente dependentes da reprodutibilidade das afinidades de ligação (FERREIRA et al., 2015; HUANG; GRINTER; ZOU, 2010).

As funções de pontuação baseadas em conhecimento relacionam energia potencial de interação com a frequência de ocorrência de pares de átomos separados a uma determinada distância. A metodologia mais comum para o desenvolvimento desse tipo de função é extrair informações estruturais de complexos ligante-proteína determinados experimentalmente. Como as referidas funções de pontuação não dependem da reprodutibilidade de afinidades de ligação ou de cálculos ab initio, elas oferecem um balanço adequado entre acuracidade e velocidade na estimativa da pose de um determinado ligante (FERREIRA et al., 2015; HUANG; GRINTER; ZOU, 2010; LI; FU; ZHANG, 2019; SHEN et al., 2011). Alguns exemplos de funções de pontuação estão elencados no **Quadro 4**.

Baseada em campo de força	Empírica	Baseada em conhecimento
AutoDock 1)	ChemPLP 4)	ASP 7)
DOCK 2)	ChemScore 5)	DrugScore 8)
GoldScore 3)	GlideScore 6)	PoseScore 9)

**Quadro 4** — Exemplos de funções de pontuação implementadas em programas de ancoragem molecular

**Fonte:** 1) MORRIS et al., 1996; 2) EWING et al., 2001; 3) JONES et al., 1997; 4) KORB; STÜTZLE; EXNER, 2009; 5) ELDRIDGE et al., 1997; 6) FRIESNER et al., 2004; 7) MOOIJ et al., 2005; 8) GOHLKE; HENDLICH; KLEBE, 2000; 9) FAN et al., 2011.

## 2. OBJETIVOS GERAIS E ESPECÍFICOS

Este trabalho tem como objetivo a identificação *in silico* de ligantes da enzima proteassoma 20S de parasitos da espécie *L. donovani*, visando atividade leishmanicida, através dos seguintes objetivos específicos:

- Validação de um modelo computacional da enzima proteassoma 20S da espécie *L. tarentolae*;
- Planejamento estrutural de 128 derivados aminoacídicos;
- Triagem virtual de 243 substâncias, sendo 128 derivados aminoacídicos, 103 benzoiltiouréias e 12 tio-hidantoínas, no modelo computacional validado;
- Análise das interações dos complexos ligante-receptor para cada um dos ligantes.

### 3. METODOLOGIA

#### 3.1 Estrutura dos ligantes submetidos à ancoragem molecular na proteassoma 20S de *L. tarentolae*

##### 3.1.1 Planejamento estrutural de 128 derivados aminoacídicos

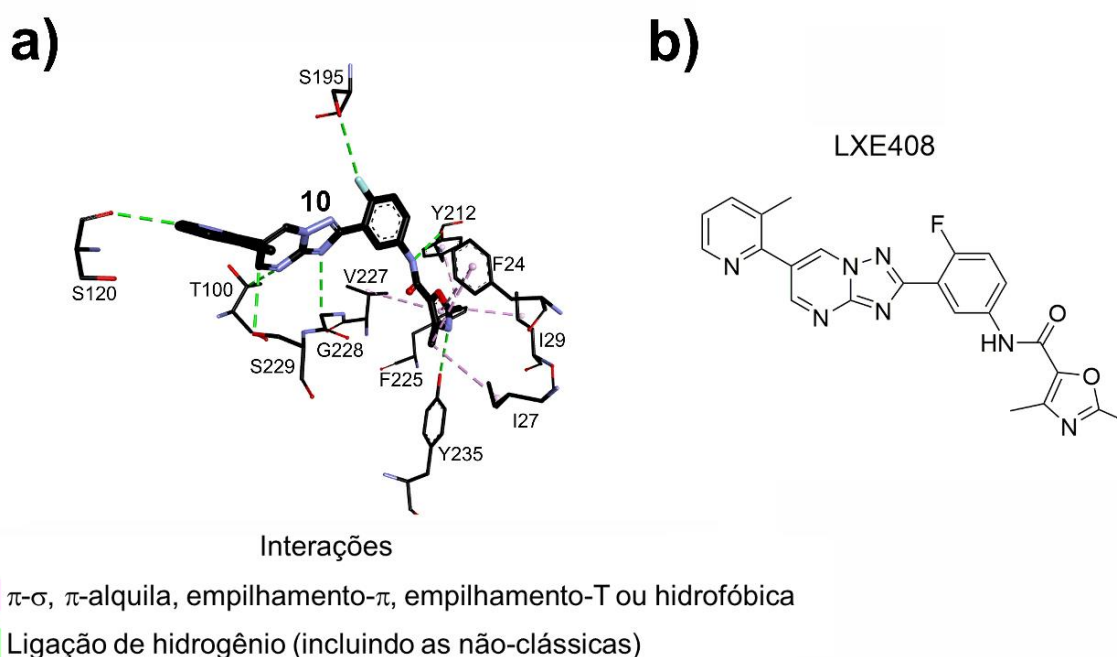
O planejamento estrutural de 128 derivados aminoacídicos foi baseado em fragmentos estruturais dos ligantes **10** e **20**.

As estruturas tridimensionais da proteassoma 20S, da espécie *L. tarentolae*, complexada com os ligantes **10** e **20**, foram elucidadas pela técnica de criomicroscopia eletrônica e apresentam resoluções de 2,80 Å e 3,40 Å, respectivamente. Ambas as estruturas foram obtidas no *Protein Data Bank* (PDB; disponível em: [www.rcsb.org/](http://www.rcsb.org/)), como arquivos de formato de extensão pdb (códigos de identificação PDB ID 6TCZ e 6QM7).

Os arquivos pdb, referentes às estruturas tridimensionais 6TCZ e 6QM7, foram abertos no programa *Discovery Studio Visualizer* (DSV; disponível em: <https://discover.3ds.com/discovery-studio-visualizer-download>), versão 21.1.0.20298. Utilizando-se a interface gráfica do referido programa, o modo de ligação dos ligantes **10** e **20** foram analisados, visando a identificação dos resíduos de aminoácidos que realizam algum tipo de interação intermolecular, com distância de até 5 Å, com ambos os ligantes. O programa DSV estimou e classificou as interações identificadas no complexo ligante-biomacromolécula, como, por exemplo, empilhamento- $\pi$ ,  $\pi$ -alquila, ligação de hidrogênio e  $\pi$ -enxofre, para cada um dos ligantes.

A **Figura 7** ilustra o modo de ligação de **10**, no sítio de ligação da estrutura tridimensional 6TCZ. A subunidade picolina, do ligante, realiza uma ligação de hidrogênio não-clássica com o átomo de oxigênio, da ligação peptídica, do resíduo S120 (3,30 Å). A subunidade bicíclica participa de três ligações de hidrogênio não-clássicas, a saber: uma com o átomo de carbono, da cadeia lateral, do resíduo catalítico de T100 (3,37 Å); uma com a hidroxila de S229 (3,23 Å); e uma com o átomo de carbono, da espinha dorsal, do resíduo G228 (3,66 Å). O átomo de flúor, do ligante, forma uma ligação de hidrogênio com a hidroxila de S195 (3,39 Å). A orientação do átomo de nitrogênio, da subunidade amida, em direção à hidroxila de Y212, favorece uma ligação de hidrogênio com esse resíduo (2,97 Å). O anel aromático, da

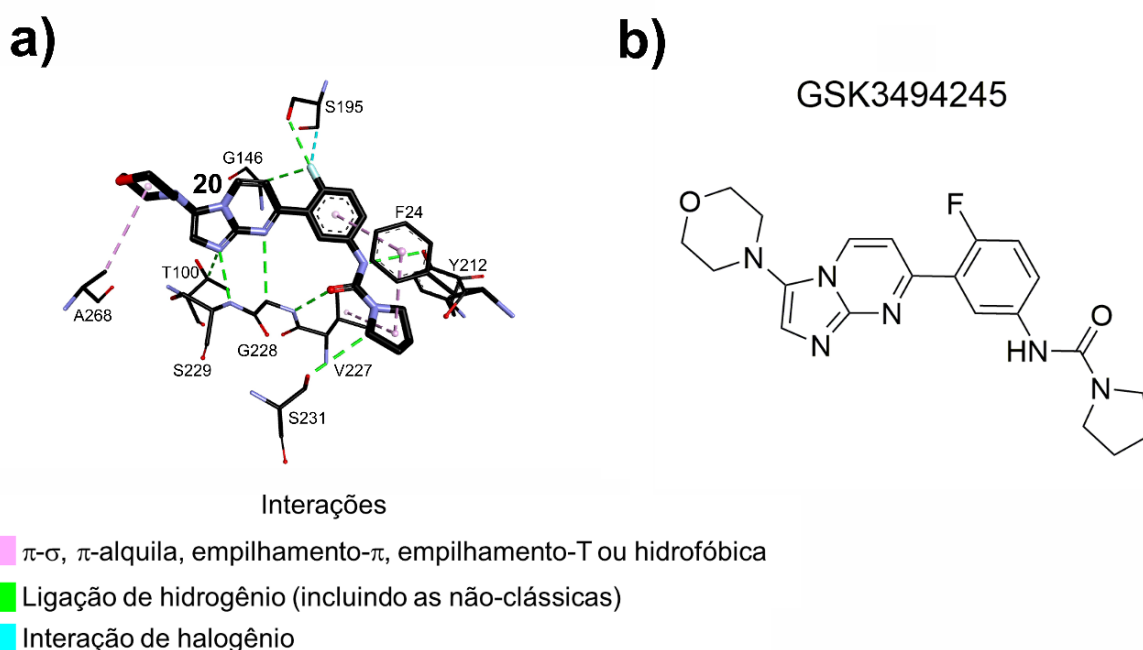
subunidade dimetiloxazola, realiza um empilhamento- $\pi$  com a cadeia lateral de F24 (4,64 Å), constitui uma interação  $\pi$ -alquila com a cadeia lateral de V227 (4,74 Å) e, especificamente, o átomo de nitrogênio, da referida subunidade, estabelece uma ligação de hidrogênio com o átomo de oxigênio, da cadeia lateral, de Y235 (3,25 Å). As metilas, da subunidade dimetiloxazola, realizam duas interações hidrofóbicas, sendo uma com a cadeia lateral de I27 (4,35 Å) e outra com I29 (3,61 Å), formam duas interações  $\pi$ -alquila, sendo uma com a cadeia lateral do resíduo F24 (4,74 Å) e outra com F225 (4,76 Å) e constitui uma interação  $\pi$ - $\sigma$  com a cadeia lateral do resíduo Y212 (3,98 Å).



**Figura 7** — **a)** Modo de ligação de **10** na estrutura 6TCZ. Os átomos de carbono, flúor, nitrogênio e oxigênio estão coloridos em preto, ciano, azul e vermelho, respectivamente. Os átomos de hidrogênio foram omitidos para melhor clareza **b)** Fórmula estrutural de **10**. Imagem gerada com os programas DSV e Corel PHOTO-PAINT, versões 21.1.0.20298 e 22.0.0.412, respectivamente  
**Fonte:** elaborado pelo autor.

A **Figura 8** representa o modo de ligação de **20** no sítio de ligação da estrutura 6QM7. A posição do grupo (pirrolidina)-1-carboxamida, do referido ligante, favorece uma interação hidrofóbica com a cadeia lateral do resíduo V227 (4,71 Å), uma interação  $\pi$ -alquila com a cadeia lateral de F24 (4,43 Å) e, adicionalmente, uma ligação de hidrogênio não-clássica com a hidroxila de S231 (3,45 Å). Ademais, um dos átomos de nitrogênio, o qual está conectado à subunidade fluorofenila, e o de oxigênio, do grupo (pirrolidina)-1-carboxamida, realizam duas ligações de hidrogênio, sendo uma

com o átomo de nitrogênio de G228 (2,79 Å) e outra com a hidroxila de Y212 (3,13 Å). O anel aromático, da subunidade fluorofenila, realiza um empilhamento- $\pi$  com a cadeia lateral do resíduo F24 (4,99 Å). A orientação, da referida subunidade, favorece duas ligações de hidrogênio, as quais envolvem o átomo de flúor, de **20**, a hidroxila, do resíduo S195 (2,69 Å), e o átomo de carbono, da espinha dorsal, de G146 (3,49 Å). Ademais, foi estimada, pelo programa DSV, uma interação de halogênio entre o átomo de flúor, de **20**, e o átomo e carbono carbonílico de S195 (3,61 Å). A subunidade bicíclica realiza três ligações de hidrogênio, uma com o átomo de nitrogênio do resíduo S229 (3,00 Å) e duas, do tipo não-clássicas, com o átomo de carbono, da espinha dorsal, do resíduo G228 (3,51 Å) e o átomo de carbono, da cadeia lateral, do resíduo catalítico de T100 (3,60 Å). A posição da morfolina, do ligante, favorece uma interação hidrofóbica com a cadeia lateral do resíduo A268 (4,62 Å).



**Figura 8** — **a)** Modo de ligação de **20** na estrutura 6QM7. Os átomos de carbono, flúor, nitrogênio e oxigênio estão coloridos em preto, ciano, azul e vermelho, respectivamente. Os átomos de hidrogênio foram omitidos para melhor clareza **b)** Fórmula estrutural de **20**. Imagem gerada com os programas DSV e Corel PHOTO-PAINT, versões 21.1.0.20298 e 22.0.0.412, respectivamente

**Fonte:** elaborado pelo autor.

Como é possível constatar no **Quadro 5**, 7 resíduos de aminoácidos, do sítio de ligação do receptor, interagem com ambos os ligantes, a saber: F24, G228, S195, S229, T100, V227 e Y212.

	F24	G228	S195	S229	T100	V227	Y212
10							
20							

Legenda interações

	Interação de halogênio
	$\pi$ - $\sigma$ , $\pi$ -alquila, empilhamento- $\pi$ , empilhamento-T ou hidrofóbica
	Ligação de hidrogênio (incluindo as não-clássicas)

**Quadro 5** — 7 resíduos de aminoácidos do sítio de ligação que interagem com ambos os ligantes, **10** e **20**

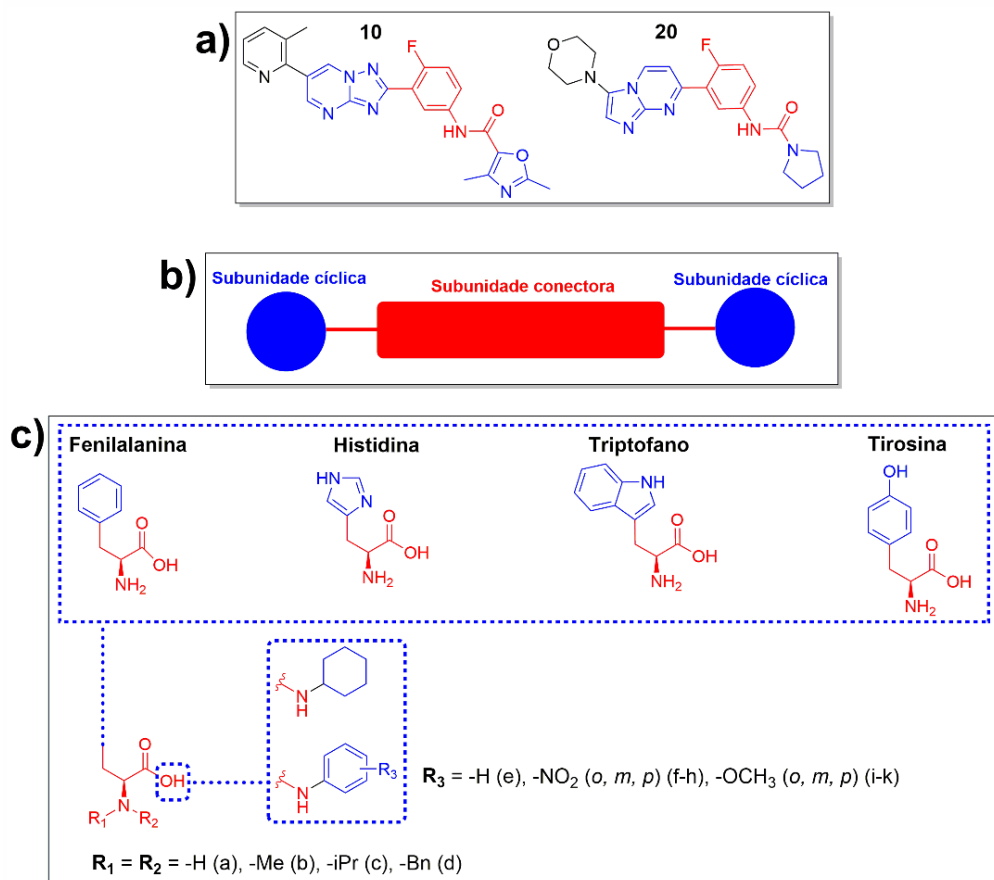
**Fonte:** elaborado pelo autor.

As subunidades dos ligantes **10** e **20** que interagem com os 7 resíduos de aminoácidos chave são: bicíclica, fluorofenila, (pirrolidina)-1-carboxamida, amida e dimetiloxazola, como é ilustrado pela **Figura 9 a)**. A disposição das referidas subunidades constitui um padrão estrutural, no qual duas subunidades cíclicas (coloridas em azul) estão separadas por uma subunidade conectora (colorida em vermelho), como pode ser observado na **Figura 9 b)**. A subunidade conectora contém aceptores e doadores de ligação de hidrogênio, bem como um grupo aromático. Entende-se, portanto, que o referido padrão estrutural observado, em ambos os ligantes, reúne os requisitos estruturais básicos para interação com os 7 resíduos de aminoácidos chave.

Objetivando interações com os 7 resíduos de aminoácidos chave, buscou-se reproduzir o referido padrão estrutural, observado nos ligantes **10** e **20**, a partir da estrutura de aminoácidos, como é representado por meio da **Figura 9 c)**. As subunidades aromáticas, oriundas da cadeia lateral dos resíduos de aminoácidos fenilalanina, histidina, tirosina e triptofano (coloridas em azul), estarão separadas por 4 átomos de uma subunidade cíclica, oriunda da substituição da hidroxila, dos resíduos de aminoácidos precursores, por ciclo-hexilamina e anilina (coloridas em azul), essa última será substituída pelos grupos nitro e metoxila nas posições orto, meta e para do anel aromático. Por fim, é proposta a substituição dos átomos de hidrogênio amínicos, dos resíduos de aminoácidos precursores, pelos grupos benzila (Bn), isopropila (iPr) e metila, de modo a introduzir uma subunidade capaz de reproduzir as interações observadas para a fluorofenila dos ligantes **10** e **20**.

Apenas os enantiômeros S foram considerados no planejamento estrutural dos 128 derivados aminoacídicos. No **APÊNDICE A** são disponibilizadas figuras que ilustram a fórmula estrutural de todos os derivados aminoacídicos.





**Figura 9** — **a)** Fórmula estrutural dos ligantes **10** e **20** **b)** Requisito estrutural básico observado nos ligantes **10** e **20** **c)** Estrutura geral dos 128 derivados aminoacídicos planejados. Imagem gerada no programa ChemDraw Pro, versão 12.0.2.1076

**Fonte:** elaborado pelo autor.

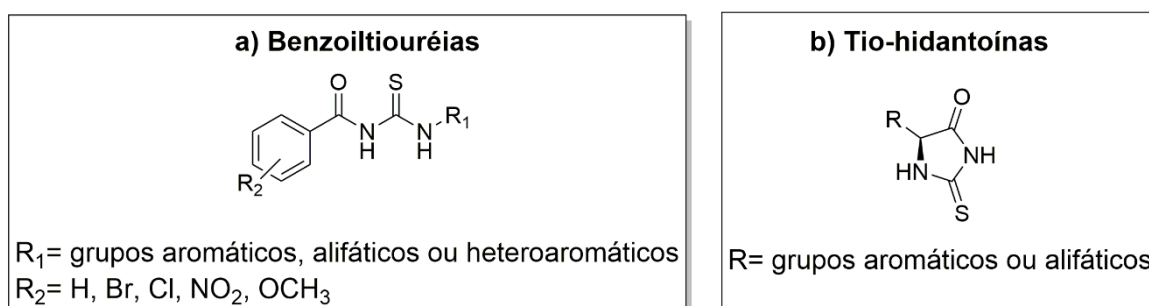
### 3.1.2 Substâncias de padrão estrutural benzoiltiouréia e tio-hidantoína

Em trabalho de colaboração, a Profa. Dra. Marcelle Bispo, da Universidade Estadual de Londrina (UEL), forneceu 115 compostos, sendo 103 benzoiltiouréias e 12 tio-hidantoínas, para serem triados virtualmente na proteossoma 20S de *L. tarentolae*, objetivando atividade leishmanicida. Na **Figura 10**, é ilustrado a estrutural geral das benzoiltiouréias e tio-hidantoínas.

Estruturalmente, a maioria das benzoiltiouréias apresentam fragmentos estruturais semelhantes aos derivados aminoacídicos, descritos na subseção 3.1.1. Os padrões estruturais assemelham-se por conterem duas subunidades cíclicas separadas por 4 átomos. As referidas substâncias demonstraram atividade inibitória

do crescimento de formas epimastigotas de parasitos da espécie *T. cruzi* (BRITO et al., 2020; PEREIRA et al., 2021).

As tio-hidantoínas compõem uma classe de compostos heterocíclicos que exibem atividade *in vitro* contra a espécie *L. amazonenses* (CAMARGO et al., 2020; CARVALHO et al., 2020). Apenas os enantiômeros S foram submetidos ao estudo computacional.



**Figura 10** — Estrutura geral **a)** das benzoiltiouréias e **b)** das tio-hidantoínas. Imagem gerada no programa ChemDraw Pro, versão 12.0.2.1076  
**Fonte:** elaborado pelo autor.

No **APÊNDICE A** são disponibilizadas figuras que ilustram a fórmula estrutural de todos as benzoiltiouréias e tio-hidantoínas.

### 3.2 Validação do modelo computacional da proteassoma 20S de *L. tarentolae* e ancoragem molecular dos ligantes

#### 3.2.1 Otimização da estrutura tridimensional da biomacromolécula

O arquivo pdb da estrutura tridimensional 6QM7, obtido de acordo com a subseção 3.1.1, foi aberto no programa DSV, onde foi realizada a remoção das cadeias de aminoácidos A-J e M-Z, cujos resíduos não constituem o sítio de ligação, bem como do ligante Z e moléculas de água vinculados as referidas cadeias de aminoácidos. Assim, o tempo despendido pelo programa de ancoragem molecular na inicialização da proteína e detecção da cavidade foi diminuído.

#### 3.2.2 Construção e otimização estrutural *in silico* de 20

Considerando-se o estado de protonação majoritário de **20** em pH intracelular (7,4), o qual foi estimado pelo programa MarvinSketch (disponível em: <https://chemaxon.com/products/marvin>), versão 20.20.0, a estrutura química tridimensional do ligante foi construída, seguida de cálculo de mecânica molecular MMFF (na sigla do inglês *Merck Molecular Force Field*), utilizando-se o programa DSV, e salva em uma pasta como um arquivo em formato de extensão mol2. Posteriormente, através da interface gráfica do programa Mercury (disponível em: <https://www.ccdc.cam.ac.uk/Community/csd-community/freemercury/>), versão 2020.1, utilizando-se o programa MOPAC (na sigla do inglês *Molecular Orbital PACkage*; disponível em: <http://openmopac.net/>), versão 2016, foi realizada a otimização estrutural de **20**, por meio de cálculo semiempírico PM7.

### 3.2.3 Redocagem de **20** na estrutura tridimensional 6QM7

A redocagem de **20**, no sítio de ligação da enzima proteassoma 20S de *L. tarentolae* (PDB ID 6QM7), a qual foi otimizada de acordo com a subseção 3.2.1, foi realizada com o programa de ancoragem molecular GOLD (na sigla do inglês *Genetic Optimisation for Ligand Docking*; disponível em: <https://www.ccdc.cam.ac.uk/solutions/csd-discovery/components/gold/>), versão 2021.2.0 (JONES, G. et al, 1997).

Inicialmente, as ligações rotacionáveis da proteína foram fixadas, os átomos de hidrogênio dos resíduos de aminoácidos da biomacromolécula foram adicionados e as moléculas de água foram removidas da estrutura tridimensional da enzima através do programa GOLD. O sítio de ligação foi definido por uma esfera centrada em  $x:170,680000$ ,  $y:144,299000$  e  $z:132,611000$ , com um raio de 15,0 Å. A redocagem de **20** foi realizada cinco vezes com cada uma das funções de pontuação ASP, ChemPLP, ChemScore, e Goldscore, de modo a determinar o valor de desvio padrão associado ao valor médio de RMSD, da pose, de maior valor de pontuação, calculada por cada uma das quatro funções de pontuação supracitadas. O complexo **20**-proteína referente à pose, de maior valor de pontuação, a qual foi estimada por cada uma das quatro funções de pontuação, foi extraído e salvo como arquivo mol2.

### **3.2.3 Ancoragem molecular dos derivados aminoacídicos, benzoiltiouréias e tio-hidantoínas na estrutura 6QM7**

Os ligantes foram construídos e otimizados, de acordo com a subseção 3.2.2. Em seguida, a ancoragem molecular foi realizada, com os mesmos parâmetros descritos na subseção 3.2.3, empregando-se a função de pontuação eleita. Após o término dos cálculos, os complexos ligante-proteína, referentes às poses de maior valor de pontuação, para cada um dos ligantes, foram extraídos e salvos como arquivos em formato de extensão mol2.

Em seguida, para todos os complexos exportados, as interações entre o ligante e os resíduos de aminoácidos chave, com distância máxima de 5 Å, foram estimadas, identificadas e classificadas, por meio da interface gráfica do programa DSV, e registradas em um quadro. No **APÊNDICE B** estão disponibilizados quadros que ilustram as interações com os resíduos de aminoácidos chave para todos os ligantes triados.

Os 10 ligantes, de cada um dos três conjuntos, que, de acordo com o programa DSV, interagiram com o maior número de resíduos de aminoácidos chave, foram eleitos.

### **3.2.4 Especificações do dispositivo empregado nos cálculos computacionais**

Computador equipado com processador Intel® Core™ i7-1165G7 CPU @ 2.80 GHz 1.69 GHz (baseado em arquitetura x64), memória RAM de 16,0 GB, placa de vídeo dedicada NVIDIA GeForce MX350, com 2048 MB GDDR5 de memória e sistema operacional Windows 10 Home Single Language, versão 21H2 (64 bits).

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Validação do modelo computacional

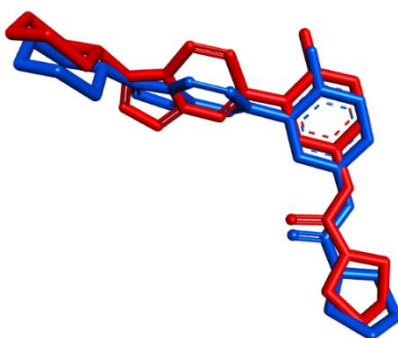
A pose, de maior valor de pontuação, de **20**, calculada pela função de pontuação ChemPLP obteve o menor valor médio de RMSD em comparação com as melhores poses obtidas pelas demais funções de pontuação do programa GOLD. Adicionalmente, a função de pontuação ChemPLP demonstrou maior reprodutibilidade na determinação da melhor pose, do referido ligante, apresentando o menor valor de desvio padrão associado ao valor médio de RMSD, como é possível constatar na **Tabela 1**.

Função de pontuação	Valor médio de RMSD	Desvio padrão
ASP	7,5273	0,1621
ChemPLP	0,8138	0,0154
ChemScore	1,6756	0,8460
GoldScore	1,2017	0,0423

**Tabela 1** — Valor médio de RMSD e de desvio padrão obtido por cada uma das funções de pontuação do programa Gold na estimativa da melhor pose de **20** no sítio de ligação da estrutura 6QM7

**Fonte:** elaborado pelo autor.

Como é possível observar, por meio da **Figura 11**, há boa sobreposição entre os átomos da pose, de maior valor de pontuação, de **20**, a qual foi estimada pela função de pontuação ChemPLP, com os átomos do referido ligante complexado na estrutura tridimensional 6QM7, a qual foi obtida experimentalmente.



**Figura 11** — Sobreposição entre a estrutura tridimensional de **20** obtida experimentalmente (átomos coloridos em vermelho) com a pose estimada pela função de pontuação ChemPLP (átomos coloridos em azul). Os átomos de hidrogênio foram omitidos para maior clareza. Imagem gerada por meio dos programas DSV e Paint, versão 21.1.0.20298 e 20H2, respectivamente

**Fonte:** elaborado pelo autor.

Inferese-se que o modelo computacional é eficiente em suas estimativas empregando-se a função de pontuação ChemPLP. Logo, a referida função foi eleita na realização da ancoragem molecular dos derivados aminoacídicos, benzoiltiouréias e tio-hidantoínas no sítio de ligação da estrutura tridimensional PDB ID 6QM7, por meio do programa GOLD.

## 4.2 Análise do modo de ligação das melhores poses eleitas de cada um dos três conjuntos de ligantes triados

### 4.2.1 As 10 melhores poses eleitas de ligantes com padrão estrutural aminoacídico

Como é possível constatar no **Quadro 6**, os ligantes **94** e **92** interagem com todos os resíduos de aminoácidos chave, enquanto que os ligantes **70**, **78**, **97**, **98**, **102**, **99** e **111** interagem com 6 e **110** interage com 5 resíduos de aminoácidos chave.

	F24	G228	S195	S229	T100	V227	Y212
<b>94</b>	■	■	■	■	■	■	■
<b>92</b>	■	■	■	■	■	■	■
<b>70</b>	■	■	■	■	■	■	■
<b>78</b>	■	■	■	■	■	■	■
<b>97</b>	■	■	■	■	■	■	■
<b>98</b>	■	■	■	■	■	■	■
<b>102</b>	■	■	■	■	■	■	■
<b>99</b>	■	■	■	■	■	■	■
<b>111</b>	■	■	■	■	■	■	■
<b>110</b>	■	■	■	■	■	■	■

Legenda interações

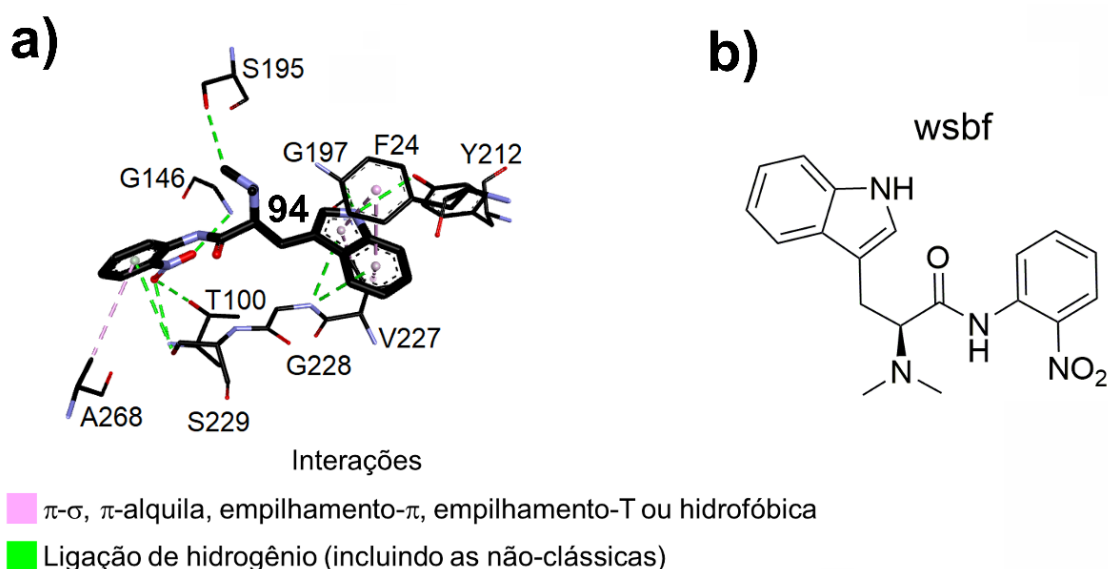
- $\pi$ - $\sigma$ ,  $\pi$ -alquila, empilhamento- $\pi$ , empilhamento-T ou hidrofóbica
- Ligação de hidrogênio (incluindo as não-clássicas)

**Quadro 6** — Interações entre os derivados aminoacídicos eleitos e os resíduos de aminoácidos chave

**Fonte:** elaborado pelo autor.

O modo de ligação da pose, de maior valor de pontuação, do ligante **94**, a qual foi calculada pela função de pontuação ChemPLP, é representado por meio da **Figura 12**. A subunidade indola, de **94**, estabelece dois empilhamentos- $\pi$  com a cadeia lateral

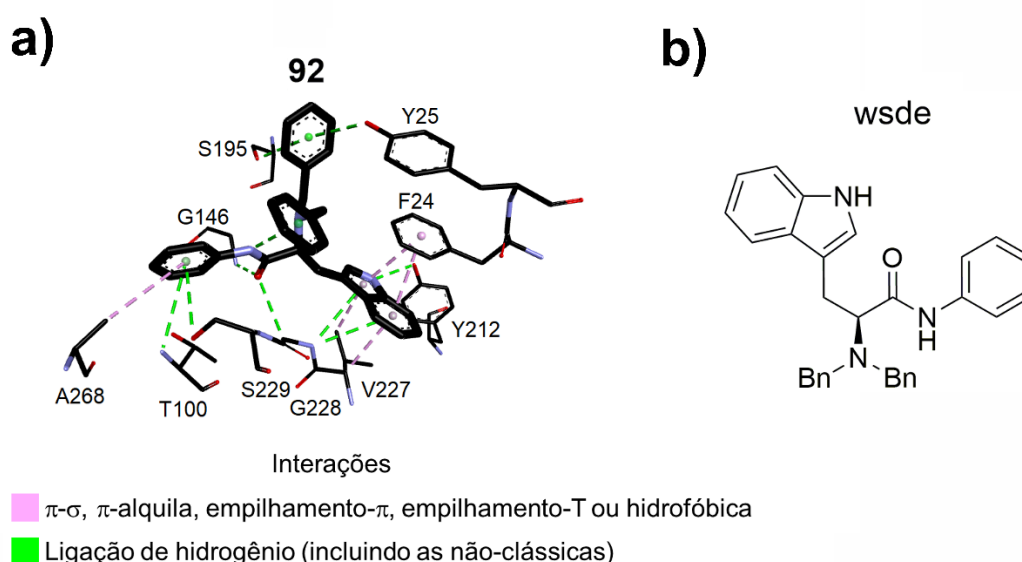
do resíduo F24 (3,86 Å e 3,91 Å), realiza uma interação  $\pi$ -alquila e outra  $\pi$ - $\sigma$  com átomos, da cadeia lateral, do resíduo V227 (4,08 Å e 3,46 Å, respectivamente) e, ademais, forma duas ligações de hidrogênio não-clássicas, do tipo  $\pi$ -doador, com o átomo de nitrogênio de G228 (3,66 Å e 3,76 Å). O átomo de nitrogênio, da subunidade indola, voltado para o átomo de oxigênio, da cadeia lateral, de Y212, realiza uma ligação de hidrogênio com o referido resíduo de aminoácido (2,98 Å) e, ademais, forma uma ligação de hidrogênio não-clássica com o átomo de carbono, da espinha dorsal, de G197 (3,78 Å). Um dos substituintes metila, de **94**, realiza uma ligação de hidrogênio não-clássica com o átomo de oxigênio, da cadeia lateral, de S195 (3,67 Å). Um dos átomos de oxigênio, do grupo nitro, forma uma ligação de hidrogênio com o átomo de nitrogênio do resíduo G146 (2,98 Å). Enquanto que o outro átomo de oxigênio, do referido grupo nitro, estabelece duas ligações de hidrogênio com o resíduo catalítico de T100 (2,66 Å e 2,98 Å). O anel aromático, do grupo nitrobenzeno, realiza uma interação  $\pi$ -alquila com o átomo de carbono, da cadeia lateral, do resíduo A268 (4,45 Å) e, adicionalmente, forma uma ligação de hidrogênio não-clássica, do tipo  $\pi$ -doador, com o átomo de oxigênio, da cadeia lateral, de S229 (4,11 Å).



**Figura 12** — **a)** Modo de ligação da melhor pose de **94** na estrutura 6QM7. Os átomos de carbono, nitrogênio e oxigênio estão coloridos em preto, azul e vermelho, respectivamente. Os átomos de hidrogênio foram omitidos para melhor clareza **b)** Fórmula estrutural de **94**. Imagem gerada com os programas DSV e Corel PHOTO-PAINT, versões 21.1.0.20298 e 22.0.0.412, respectivamente  
**Fonte:** elaborado pelo autor.

O modo de ligação da melhor pose de **92**, a qual foi estimada pela função de pontuação ChemPLP, no sítio de ligação da estrutura 6QM7, é demonstrado pela

**Figura 13.** A subunidade indola, de **92**, realiza dois empilhamentos- $\pi$  com a cadeia lateral do resíduo F24 (3,82 Å e 3,87 Å), forma duas interações  $\pi$ - $\sigma$  com átomos de carbono do resíduo V227 (3,38 Å e 3,74 Å) e, ademais, estabelece duas ligações de hidrogênio não-clássicas, do tipo  $\pi$ -doador, com o átomo de nitrogênio de G228 (3,81 Å e 3,92 Å). O átomo de nitrogênio, da subunidade indola, realiza uma ligação de hidrogênio com a hidroxila de Y212 (2,62 Å). Um dos substituintes benzila, de **92**, forma uma ligação de hidrogênio não-clássica, do tipo  $\pi$ -doador, com o átomo de oxigênio, da cadeia lateral, de cada um dos seguintes resíduos de aminoácidos: S195 (3,79 Å) e Y25 (3,67 Å). O outro substituinte benzila realiza uma ligação de hidrogênio não-clássica, do tipo  $\pi$ -doador, intramolecular, com o átomo de nitrogênio da subunidade amida (3,78 Å). O átomo de oxigênio carbonílico, do ligante, forma uma ligação de hidrogênio com o átomo de nitrogênio de G146 (2,65 Å) e, adicionalmente, estabelece uma ligação de hidrogênio não-clássica com o átomo de carbono, da espinha dorsal, do resíduo G228 (3,45 Å). A posição da subunidade fenila, do ligante, favorece uma interação  $\pi$ -alquila com a cadeia lateral do resíduo A268 (4,62 Å) e, adicionalmente, estabelece duas ligações de hidrogênio não-clássicas, do tipo  $\pi$ -doador, sendo uma com o átomo de nitrogênio do resíduo catalítico de T100 (4,04 Å) e outra com a hidroxila de S229 (3,83 Å).

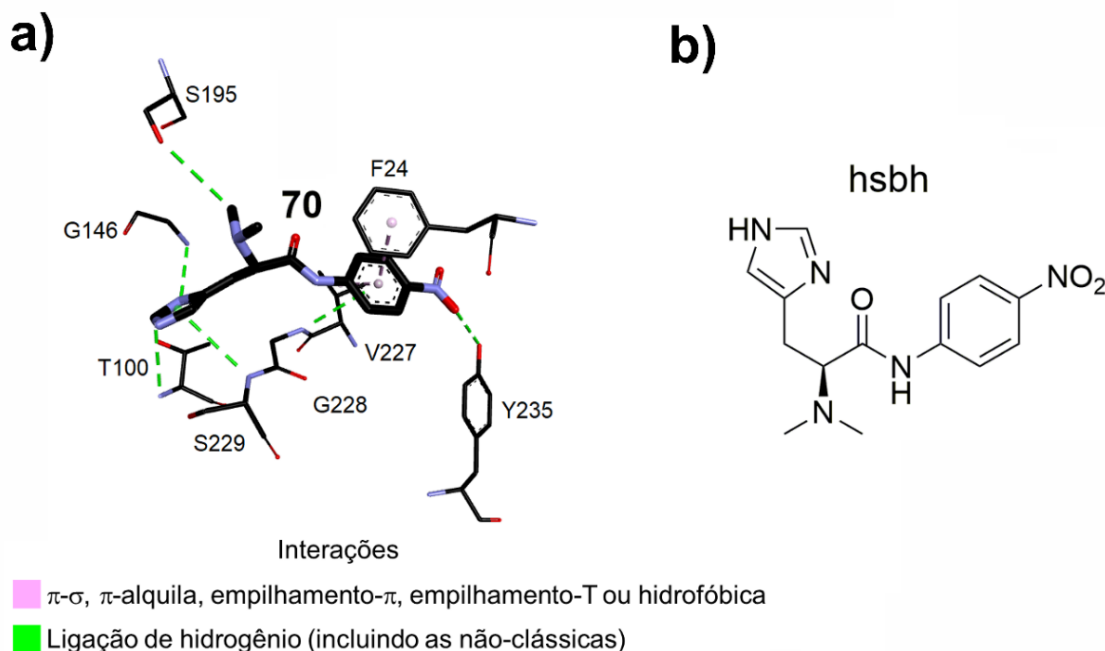


**Figura 13** — **a)** Modo de ligação da melhor pose de **92** na estrutura 6QM7. Os átomos de carbono, nitrogênio e oxigênio estão coloridos em preto, azul e vermelho, respectivamente. Os átomos de hidrogênio foram omitidos para melhor clareza **b)** Fórmula estrutural de **92**. Imagem gerada com os programas DSV e Corel PHOTO-PAINT, versões 21.1.0.20298 e 22.0.0.412, respectivamente

**Fonte:** elaborado pelo autor.



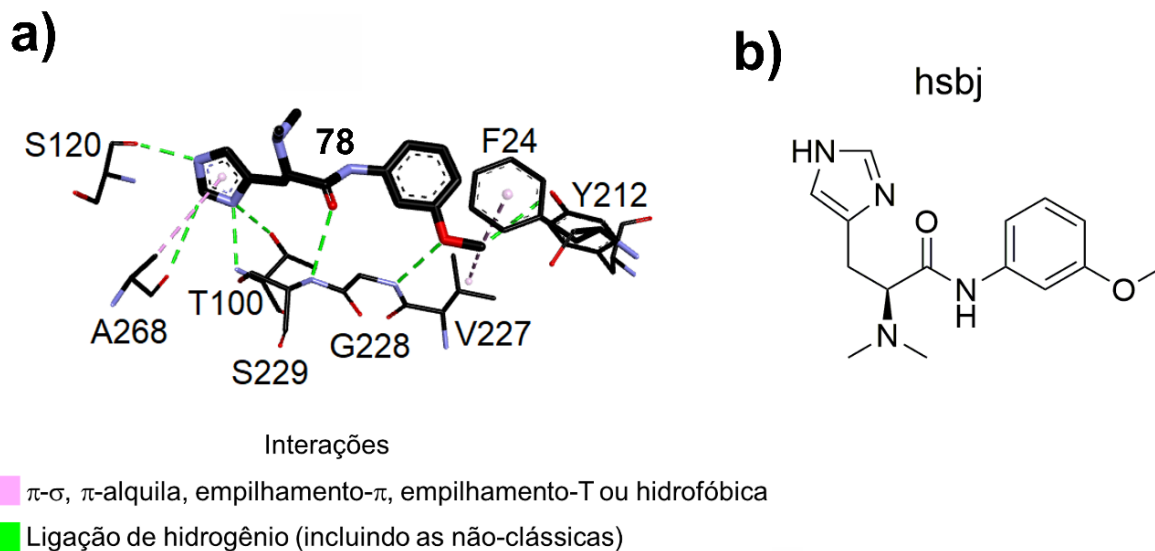
A **Figura 14** demonstra o modo de ligação da pose de **70**, a qual foi a melhor ranqueada pela função de pontuação ChemPLP, no sítio de ligação da biomacromolécula.



**Figura 14** — **a)** Modo de ligação da melhor pose de **70** na estrutura 6QM7. Os átomos de carbono, nitrogênio e oxigênio estão coloridos em preto, azul e vermelho, respectivamente. Os átomos de hidrogênio foram omitidos para melhor clareza **b)** Fórmula estrutural de **70**. Imagem gerada com os programas DSV e Corel PHOTO-PAINT, versões 21.1.0.20298 e 22.0.0.412, respectivamente  
**Fonte:** elaborado pelo autor.

A posição da subunidade imidazola, de **70**, favorece a formação de duas ligações de hidrogênio não-clássicas com os átomos de nitrogênio de G146 (2,85 Å) e S229 (3,91 Å) e, adicionalmente, realiza uma ligação de hidrogênio com o átomo de nitrogênio do resíduo catalítico de T100 (3,59 Å). Um dos substituintes metila, do ligante, estabelece uma ligação de hidrogênio não-clássica com o átomo de oxigênio, da cadeia lateral, do resíduo de S195 (3,66 Å). O anel aromático, do grupo nitrobenzeno, realiza um empilhamento- $\pi$  com a cadeia lateral do resíduo de F24 (3,96 Å), forma uma interação  $\pi$ -alquila com a cadeia lateral de V227 (4,00 Å) e, ademais, constitui uma ligação de hidrogênio não-clássica, do tipo  $\pi$ -doador, com o átomo de nitrogênio de G228 (3,94 Å). A orientação do grupo nitro, do ligante, favorece uma ligação de hidrogênio não-clássica entre um dos seus átomos de oxigênio e a hidroxila de Y235 (3,00 Å).

O modo de ligação da pose, de maior valor de pontuação, de **78**, a qual foi obtida pela função de pontuação ChemPLP, é representado por meio da **Figura 15**.

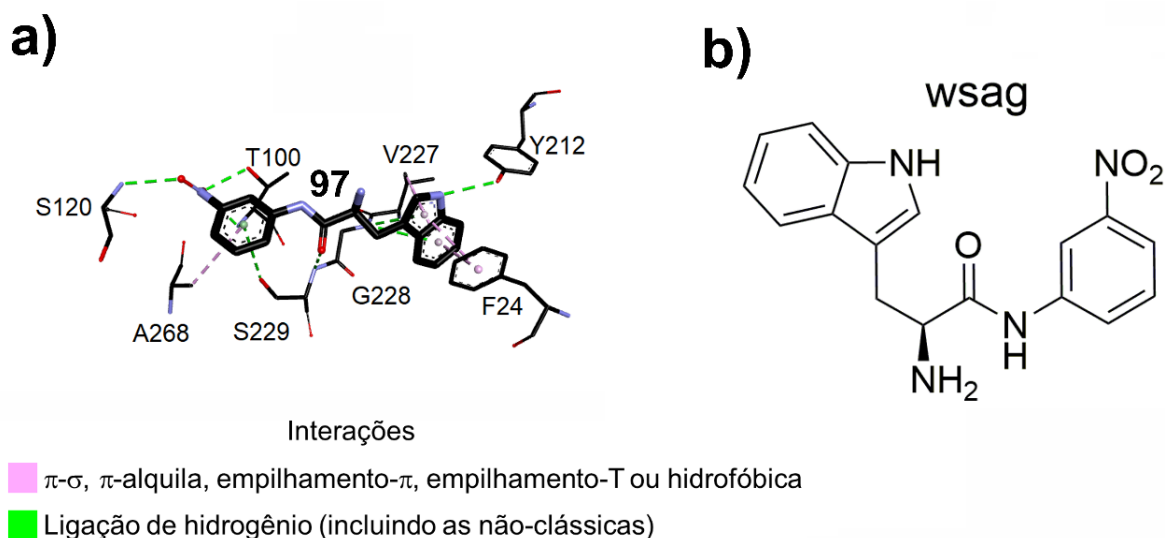


**Figura 15** — **a)** Modo de ligação da melhor pose de **78** na estrutura 6QM7. Os átomos de carbono, nitrogênio e oxigênio estão coloridos em preto, azul e vermelho, respectivamente. Os átomos de hidrogênio foram omitidos para melhor clareza **b)** Fórmula estrutural de **78**. Imagem gerada com os programas DSV e Corel PHOTO-PAINT, versões 21.1.0.20298 e 22.0.0.412, respectivamente

**Fonte:** elaborado pelo autor.

A posição da subunidade imidazola, de **78**, favorece uma ligação de hidrogênio não-clássica com o átomo de oxigênio, da ligação peptídica, de cada um dos seguintes resíduos de aminoácidos: A268 (3,79 Å) e S120 (2,56 Å). Ademais, a referida subunidade, estabelece duas ligações de hidrogênio com o resíduo catalítico de T100, sendo uma com o átomo de oxigênio (2,91 Å), da cadeia lateral, e outra com o átomo de nitrogênio (2,74 Å) do referido resíduo de aminoácido. Uma interação  $\pi$ -alquila entre o átomo de carbono, da cadeia lateral, de A268 (4,57 Å) e a subunidade imidazola, do ligante, também foi estimada pelo programa DSV. O átomo de oxigênio carbonílico, de **78**, constitui uma ligação de hidrogênio com o átomo de nitrogênio de G228 (2,95 Å). O átomo de oxigênio, da metoxila, forma uma ligação de hidrogênio com o átomo de nitrogênio do resíduo G228 (2,95 Å). A metila, do referido grupo metoxila, está orientada na direção do átomo de oxigênio, da cadeia lateral, de Y212, favorecendo a formação de uma ligação de hidrogênio não-clássica com o referido resíduo (3,59 Å), também realiza uma interação hidrofóbica com a cadeia lateral de V227 (3,86 Å) e, adicionalmente, forma uma interação  $\pi$ - $\sigma$  com a cadeia lateral de F24 (3,70 Å).

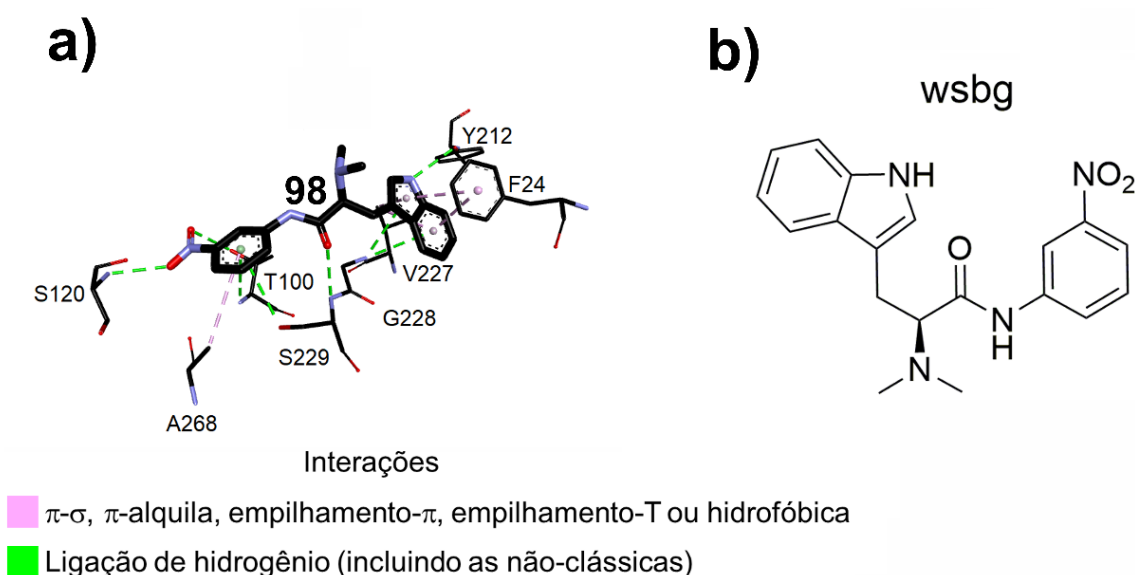
As interações, estimadas pelo programa DSV, da melhor pose de **97**, a qual foi calculada pela função de pontuação ChemPLP, no sítio de ligação da estrutura 6QM7, são representadas por meio da **Figura 16**.



**Figura 16** — **a)** Modo de ligação da melhor pose de **97** na estrutura 6QM7. Os átomos de carbono, nitrogênio e oxigênio estão coloridos em preto, azul e vermelho, respectivamente. Os átomos de hidrogênio foram omitidos para melhor clareza **b)** Fórmula estrutural de **97**. Imagem gerada com os programas DSV e Corel PHOTO-PAINT, versões 21.1.0.20298 e 22.0.0.412, respectivamente  
**Fonte:** elaborado pelo autor.

A subunidade indola, de **97**, participa de dois empilhamentos- $\pi$  com a cadeia lateral do resíduo F24 (3,89 Å e 3,90 Å), realiza duas interações  $\pi$ - $\sigma$  com um átomo de carbono, da cadeia lateral, de V227 (3,38 Å e 3,97 Å) e também estabelece duas ligações de hidrogênio não-clássicas, do tipo  $\pi$ -doador, com o átomo de nitrogênio de G228 (3,76 Å e 3,76 Å). A orientação do átomo de oxigênio carbonílico, do ligante, favorece uma ligação de hidrogênio com o átomo de nitrogênio de S229 (2,88 Å). O anel aromático, do grupo nitrobenzeno do ligante, forma uma interação  $\pi$ -alquila com o átomo de carbono, da cadeia lateral, do resíduo A268 (4,58 Å) e, adicionalmente, realiza duas ligações de hidrogênio não-clássicas, do tipo  $\pi$ -doador, sendo uma com o átomo de oxigênio, da cadeia lateral, de S229 (4,19 Å) e outra com o átomo de nitrogênio do resíduo amino-terminal de T100 (4,06 Å). Os átomos de oxigênio, do grupo nitro, estão envolvidos em três ligações de hidrogênio, sendo duas com átomos do resíduo catalítico de T100 (2,77 Å e 2,85 Å) e uma com o átomo de nitrogênio de S120 (3,03 Å).

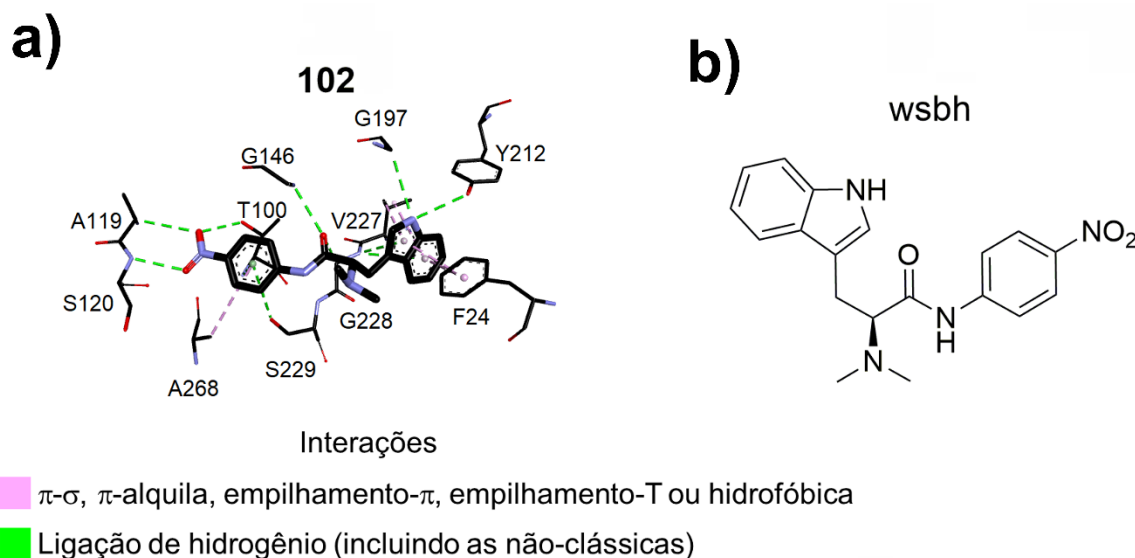
Na **Figura 17**, é ilustrado o modo de ligação da melhor pose de **98**, a qual foi obtida pela função de pontuação ChemPLP, no sítio de ligação do receptor. A subunidade indola, de **98**, realiza dois empilhamentos- $\pi$  com a cadeia lateral do resíduo F24 (3,95 Å e 3,95 Å), forma duas interações  $\pi$ - $\sigma$  com o átomo de carbono, da cadeia lateral, de V227 (3,36 Å e 3,89 Å) e, adicionalmente, estabelece duas ligações de hidrogênio não-clássicas, do tipo  $\pi$ -doador, com o átomo de nitrogênio do resíduo G228 (3,66 Å e 3,75 Å). O átomo de nitrogênio, da subunidade indola, realiza uma ligação de hidrogênio com a hidroxila do resíduo Y212 (2,83 Å). O átomo de oxigênio carbonílico, do ligante, estabelece uma ligação de hidrogênio com o átomo de nitrogênio de S229 (2,85 Å). O anel aromático, do grupo nitrobenzeno, constitui duas ligações de hidrogênio não-clássicas, do tipo  $\pi$ -doador, sendo uma com a hidroxila de S229 (4,00 Å) e outra com o átomo de nitrogênio do resíduo amino-terminal de T100 (3,77 Å). Adicionalmente, uma interação  $\pi$ -alquila entre o referido anel aromático, do ligante, e o átomo de carbono, da cadeia lateral, de A268 (4,47 Å) foi estimada pelo programa DSV. Os átomos de oxigênio, do grupo nitro, participam de duas ligações de hidrogênio, sendo uma com o átomo de oxigênio da cadeia lateral do resíduo catalítico de T100 (2,78 Å) e outra com o átomo de nitrogênio de S120 (2,76 Å).



**Figura 17** — **a)** Modo de ligação da melhor pose de **98** na estrutura 6QM7. Os átomos de carbono, nitrogênio e oxigênio estão coloridos em preto, azul e vermelho, respectivamente. Os átomos de hidrogênio foram omitidos para melhor clareza **b)** Fórmula estrutural de **98**. Imagem gerada com os programas DSV e Corel PHOTO-PAINT, versões 21.1.0.20298 e 22.0.0.412, respectivamente

**Fonte:** elaborado pelo autor.

O modo de ligação da pose, de maior valor de pontuação, do ligante **102**, a qual foi estimada pela função de pontuação ChemPLP, no sítio de ligação da biomacromolécula, é representado pela **Figura 18**.

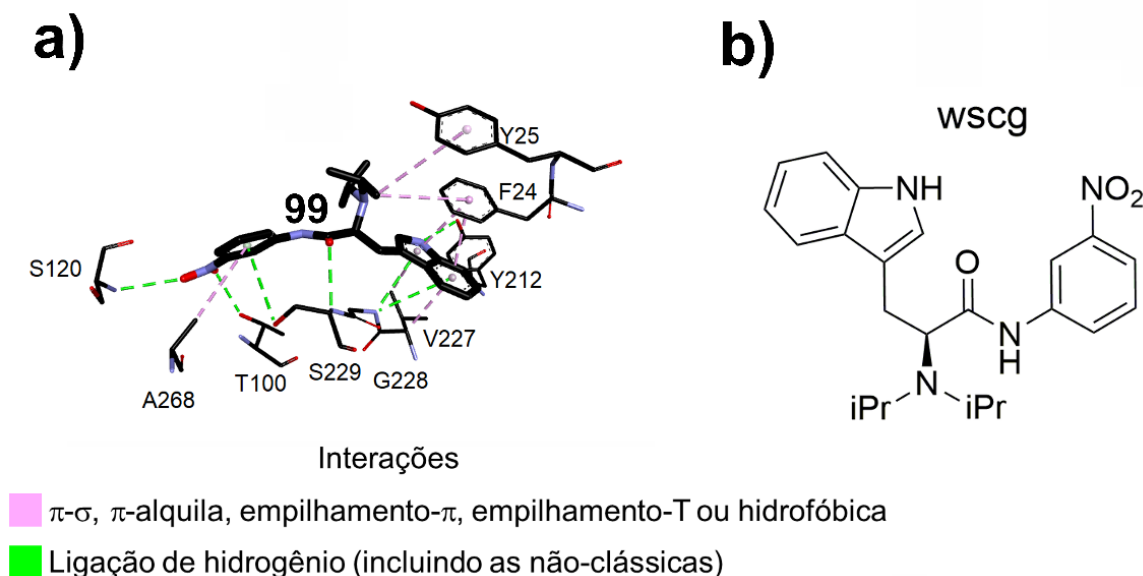


**Figura 18** — **a)** Modo de ligação da melhor pose de **102** na estrutura 6QM7. Os átomos de carbono, nitrogênio e oxigênio estão coloridos em preto, azul e vermelho, respectivamente. Os átomos de hidrogênio foram omitidos para melhor clareza **b)** Fórmula estrutural de **102**. Imagem gerada com os programas DSV e Corel PHOTO-PAINT, versões 21.1.0.20298 e 22.0.0.412, respectivamente  
**Fonte:** elaborado pelo autor.

A subunidade indola, de **102**, estabelece dois empilhamentos- $\pi$  com a cadeia lateral de F24 (3,87 Å e 3,89 Å), realiza uma interação  $\pi$ - $\sigma$  e outra  $\pi$ -alquila com o resíduo V227 (3,51 Å e 4,09 Å, respectivamente) e, também, forma duas ligações de hidrogênio não-clássicas, do tipo  $\pi$ -doador, com o átomo de nitrogênio de G228 (3,60 Å e 3,76 Å). O átomo de nitrogênio, da subunidade indola, realiza uma ligação de hidrogênio com o átomo de oxigênio, da cadeia lateral, de Y212 (3,13 Å) e também realiza uma ligação de hidrogênio, não-clássica, com o átomo de carbono, da espinha dorsal, do resíduo G197 (3,79 Å). O átomo de oxigênio carbonílico, do ligante, participa de duas ligações de hidrogênio, sendo uma com o átomo de nitrogênio de G146 (3,02 Å) e outra, não-clássica, com o átomo de carbono, da espinha dorsal, do resíduo G228 (3,40 Å). O anel aromático, do grupo nitrobenzeno, estabelece duas ligações de hidrogênio não-clássicas, do tipo  $\pi$ -doador, sendo uma com a hidroxila de S229 (4,18 Å) e outra com o átomo de nitrogênio do resíduo amino-terminal de T100 (3,71 Å). Ademais, o referido anel aromático forma uma interação  $\pi$ -alquila com a cadeia lateral de A268 (4,95 Å). Os átomos de oxigênio, do grupo nitro, realizam três ligações de

hidrogênio, a saber: uma com o átomo de oxigênio, da cadeia lateral, do resíduo catalítico de T100 (2,89 Å); uma com o átomo de carbono, da espinha dorsal, de A119 (3,71 Å); e uma com o átomo de nitrogênio de S120 (2,90 Å).

A melhor pose ranqueada para o ligante **99**, a qual foi ranqueada pela função de pontuação ChemPLP, é demonstrada por meio da **Figura 19**.

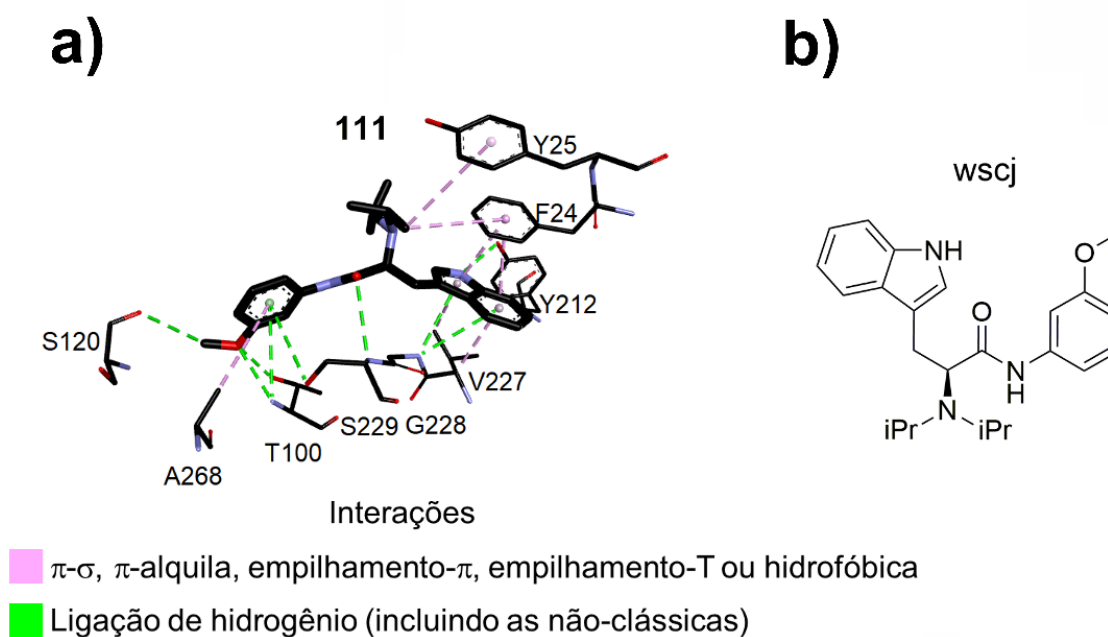


**Figura 19** — **a)** Modo de ligação da melhor pose de **99** na estrutura 6QM7. Os átomos de carbono, nitrogênio e oxigênio estão coloridos em preto, azul e vermelho, respectivamente. Os átomos de hidrogênio foram omitidos para melhor clareza **b)** Fórmula estrutural de **99**. Imagem gerada com os programas DSV e Corel PHOTO-PAINT, versões 21.1.0.20298 e 22.0.0.412, respectivamente **Fonte:** elaborado pelo autor.

A subunidade indola, de **99**, participa de dois empilhamentos- $\pi$  com a cadeia lateral do resíduo F24 (3,76 Å e 3,90 Å), realiza duas interações  $\pi$ - $\sigma$  com o resíduo V227 (3,47 Å e 3,80 Å) e forma duas ligações de hidrogênio não-clássicas, do tipo  $\pi$ -doador, com o átomo de nitrogênio de G228 (3,65 Å e 4,08 Å). O átomo de nitrogênio, da subunidade indola, estabelece uma ligação de hidrogênio com a hidroxila Y212 (2,84 Å). Um dos substituintes isopropila, do ligante, interage com a cadeia lateral dos resíduos F24 (4,85 Å) e Y25 (4,81 Å), por meio de uma interação  $\pi$ -alquila. O átomo de oxigênio carbonílico, do ligante, realiza uma ligação de hidrogênio com o átomo de nitrogênio do resíduo S229 (3,02 Å). O anel aromático, do grupo nitrobenzeno, está envolvido em uma ligação de hidrogênio não-clássica, do tipo  $\pi$ -doador, com o átomo de oxigênio, da cadeia lateral, de S229 (4,11 Å) e, também, forma uma interação hidrofóbica, do tipo  $\pi$ -alquila, com o átomo de carbono da cadeia lateral de A268 (4,68

Å). Através dos átomos de oxigênio do grupo nitro, o ligante participa de duas ligações de hidrogênio, as quais envolvem o átomo de oxigênio da cadeia lateral do resíduo catalítico de T100 (2,62 Å) e o átomo de nitrogênio de S120 (3,18 Å).

Na **Figura 20**, é ilustrado o modo de ligação da melhor pose de **111**, a qual foi estimada pela função de pontuação ChemPLP, no sítio de ligação da biomacromolécula.

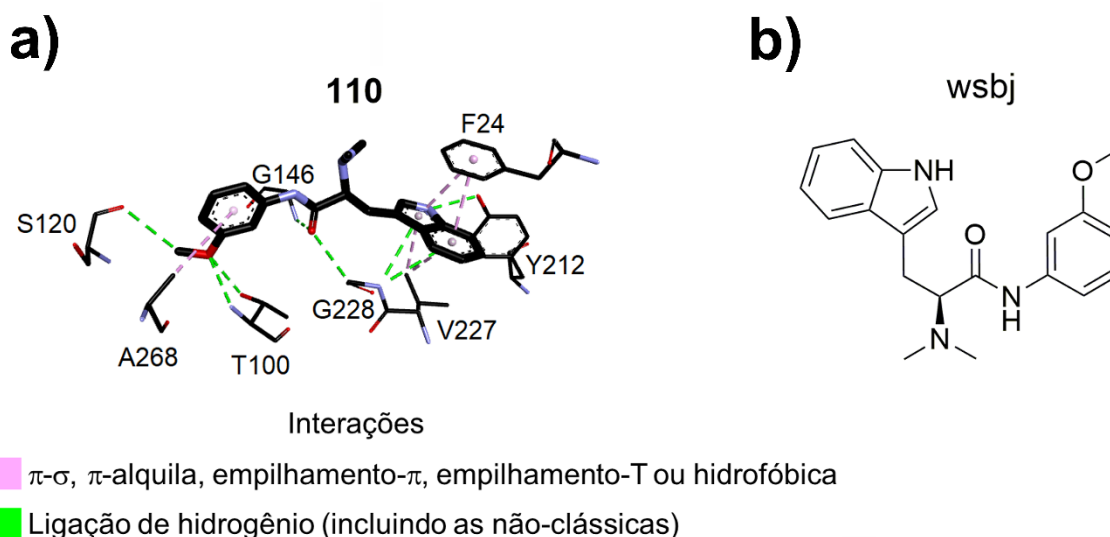


**Figura 20** — **a)** Modo de ligação da melhor pose de **111** na estrutura 6QM7. Os átomos de carbono, nitrogênio e oxigênio estão coloridos em preto, azul e vermelho, respectivamente. Os átomos de hidrogênio foram omitidos para melhor clareza **b)** Fórmula estrutural de **111**. Imagem gerada com os programas DSV e Corel PHOTO-PAINT, versões 21.1.0.20298 e 22.0.0.412, respectivamente **Fonte:** elaborado pelo autor.

A subunidade indola, de **111**, estabelece dois empilhamentos- $\pi$  com a cadeia lateral de F24 (3,75 Å e 3,94 Å), realiza duas interações  $\pi$ - $\sigma$  com o resíduo V227 (3,46 Å e 3,77 Å) e, adicionalmente, forma duas ligações de hidrogênio não-clássicas, do tipo  $\pi$ -doador, com o átomo de nitrogênio de G228 (3,66 Å e 4,08 Å). O átomo de nitrogênio, da referida subunidade indola, constitui uma ligação de hidrogênio com a hidroxila de Y212 (2,82 Å). A posição de um dos substituintes isopropila, do ligante, favorece uma interação  $\pi$ -alquila com a cadeia lateral de cada um dos seguintes resíduos: F24 (4,76 Å) e Y25 (4,71 Å). O átomo de oxigênio carbonílico, do ligante, forma uma ligação de hidrogênio com o átomo de nitrogênio de S229 (3,40 Å). O anel aromático, da subunidade metoxifenila, estabelece duas ligações de hidrogênio não-clássicas, do tipo  $\pi$ -doador, com o átomo de oxigênio, da cadeia lateral, de S229 (4,18

Å) e com o átomo de nitrogênio do resíduo catalítico T100 (4,09 Å) e, ademais, forma uma interação  $\pi$ -alquila com o átomo de carbono, da cadeia lateral, de A268 (4,87 Å). O átomo de oxigênio, do grupo metoxila, interage com os átomos de nitrogênio e oxigênio do resíduo T100, através de duas ligações de hidrogênio (2,99 Å e 2,61 Å). Além disso, a posição da metila, do referido grupo metoxila, favorece uma ligação de hidrogênio não-clássica, com o átomo de oxigênio, da ligação peptídica de S120 (3,38 Å).

Na **Figura 21**, é demonstrado o modo de ligação da melhor pose de **110**, a qual foi estimada pela função de pontuação ChemPLP, no sítio de ligação da estrutura 6QM7.



**Figura 21** — **a)** Modo de ligação da melhor pose de **110** na estrutura 6QM7. Os átomos de carbono, nitrogênio e oxigênio estão coloridos em preto, azul e vermelho, respectivamente. Os átomos de hidrogênio foram omitidos para melhor clareza **b)** Fórmula estrutural de **110**. Imagem gerada com os programas DSV e Corel PHOTO-PAINT, versões 21.1.0.20298 e 22.0.0.412, respectivamente **Fonte:** elaborado pelo autor.

A subunidade indola, de **110**, estabelece dois empilhamentos- $\pi$  com a cadeia lateral do resíduo F24 (3,81 Å e 3,91 Å), realiza duas interações  $\pi$ - $\sigma$  com o átomo de carbono, da cadeia lateral, do resíduo V227 (3,42 Å e 3,93 Å) e, adicionalmente, forma duas ligações de hidrogênio não-clássicas, do tipo  $\pi$ -doador, com o átomo de nitrogênio de G228 (3,82 Å e 3,82 Å). O átomo de nitrogênio, da referida subunidade indola, constitui uma ligação de hidrogênio com a hidroxila de Y212 (2,76 Å). O átomo de oxigênio carbonílico, do ligante, estabelece uma ligação de hidrogênio com o átomo de nitrogênio de G146 (2,84 Å) e, adicionalmente, forma uma ligação de hidrogênio



não-clássica com o átomo de carbono, da espinha dorsal, de G228 (3,25 Å). O anel aromático, da subunidade metoxifenila, estabelece uma interação  $\pi$ -alquila com o átomo de carbono, da cadeia lateral, de A268 (4,64 Å). A posição do grupo metoxila, do ligante, favorece 3 ligações de hidrogênio, sendo duas com o resíduo catalítico de T100 (2,78 Å e 2,96 Å) e uma com o átomo de oxigênio, da ligação peptídica, de S120 (3,30 Å).

#### 4.2.2 As 10 melhores poses eleitas de ligantes com padrão estrutural benzoiltiouréia

Como é possível observar no **Quadro 7**, os ligantes **188**, **192**, **222** e **249** interagem com 6 resíduos de aminoácidos chave, e os demais ligantes interagem com 5 resíduos chave. Ademais, todas as benzoiltiouréias eleitas interagiram com o resíduo catalítico de T100.

	F24	G228	S229	T100	V227	Y212
<b>188</b>						
<b>192</b>						
<b>222</b>						
<b>249</b>						
<b>172</b>						
<b>182</b>						
<b>183</b>						
<b>184</b>						
<b>185</b>						
<b>186</b>						

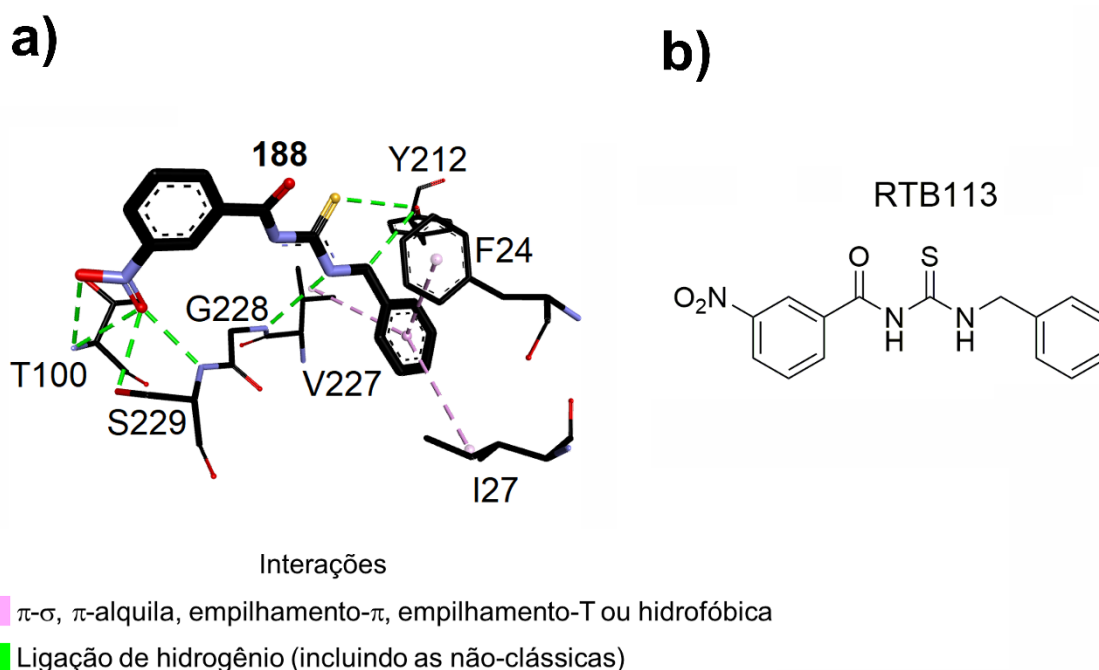
Legenda interações

- $\pi$ - $\sigma$ ,  $\pi$ -alquila, empilhamento- $\pi$ , empilhamento-T ou hidrofóbica
- Ligação de hidrogênio (incluindo as não-clássicas)

**Quadro 7** — Interações entre as benzoiltiouréias eleitas e os resíduos de aminoácidos chave  
**Fonte:** elaborado pelo autor.

O modo de ligação da pose, melhor ranqueada, de **188**, a qual foi estimada pela função de pontuação ChemPLP, é demonstrado pela **Figura 22**. O anel aromático, da subunidade benzila de **188**, estabelece um empilhamento- $\pi$  com a cadeia lateral do resíduo F24 (4,55 Å) e realiza uma interação  $\pi$ -alquila com átomos, da cadeia lateral, de cada um dos seguintes resíduos: I27 (4,99 Å) e V227 (4,71 Å). A

referida subunidade benzila constitui uma ligação de hidrogênio não-clássica com o átomo de oxigênio, da cadeia lateral, de Y212 (3,10 Å). O átomo de enxofre, do ligante, participa de uma ligação de hidrogênio com a hidroxila de Y212 (3,52 Å). Um dos átomos de nitrogênio, da subunidade tiouréia, o qual está conectado à subunidade benzila, estabelece uma ligação de hidrogênio com o átomo de nitrogênio de G228 (3,22 Å). **188** participa de quatro ligações de hidrogênio envolvendo os átomos de oxigênio do grupo nitro, o átomo de nitrogênio do resíduo catalítico T100 (3,00 Å e 3,13 Å), o átomo de oxigênio, da cadeia lateral, e o de nitrogênio do resíduo S229 (2,83 Å e 2,72 Å, respectivamente)

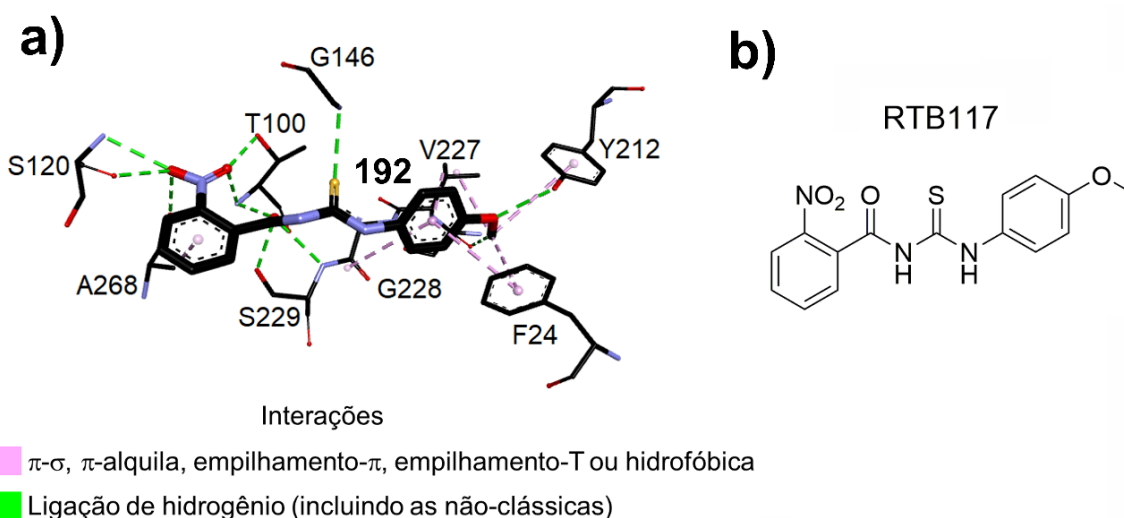


**Figura 22** — **a)** Modo de ligação da melhor pose de **188** na estrutura 6QM7. Os átomos de carbono, enxofre, nitrogênio e oxigênio estão coloridos em preto, amarelo, azul e vermelho, respectivamente. Os átomos de hidrogênio foram omitidos para melhor clareza **b)** Fórmula estrutural de **188**. Imagem gerada com os programas DSV e Corel PHOTO-PAINT, versões 21.1.0.20298 e 22.0.0.412, respectivamente

**Fonte:** elaborado pelo autor.

A pose, de maior valor de pontuação, de **192**, a qual foi obtida pela função de pontuação ChemPLP, bem como as interações entre ela e resíduos de aminoácidos do sítio de ligação, estão representados por meio da **Figura 23**. A metoxila, do ligante, forma uma interação  $\pi$ -alquila com a cadeia lateral de cada um dos resíduos F24 (4,42 Å) e Y212 (4,51 Å), realiza uma interação hidrofóbica com a cadeia lateral de V227 (3,44 Å), constitui uma ligação de hidrogênio não-clássica com o átomo de oxigênio, da ligação peptídica, de S226 (3,68 Å) e uma ligação de hidrogênio com a hidroxila de

Y212 (2,78 Å). O anel aromático, da subunidade metoxifenila, estabelece um empilhamento- $\pi$  com a cadeia lateral de F24 (4,31 Å), realiza uma interação  $\pi$ -alquila com a cadeia lateral de V227 (3,95 Å) e participa de um empilhamento amida- $\pi$  com átomos que constituem a ligação peptídica formada entre os resíduos G228 e S229 (4,75 Å). O átomo de enxofre, da subunidade tiouréia, constitui uma ligação de hidrogênio não-clássica com o átomo de nitrogênio de G146 (3,04 Å). O átomo de oxigênio carbonílico, do ligante, estabelece uma ligação de hidrogênio com o átomo de oxigênio, da cadeia lateral, e outra com o átomo de nitrogênio do resíduo S229 (2,78 Å e 3,15 Å, respectivamente) e, adicionalmente, forma uma ligação de hidrogênio com o átomo de nitrogênio do resíduo amino-terminal T100 (2,99 Å). O ligante participa de três ligações de hidrogênio abrangendo o grupo nitro e os resíduos T100 (2,81 Å e 2,85 Å) e S120 (2,93 Å). O anel aromático, do grupo nitrobenzeno, forma uma interação  $\pi$ - $\sigma$  com a cadeia lateral de A268 (3,60 Å).

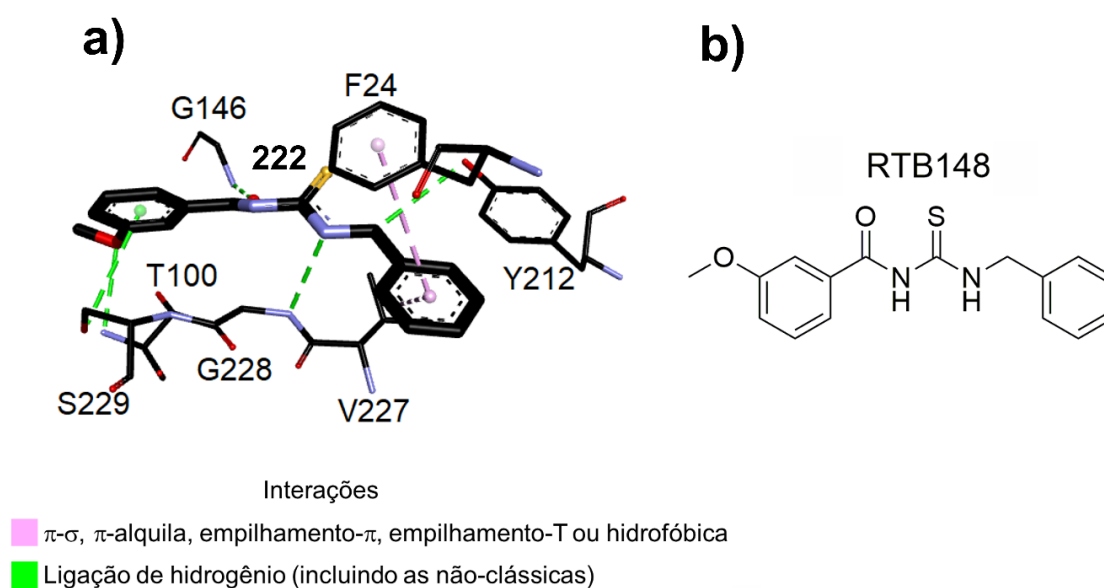


**Figura 23** — **a)** Modo de ligação da melhor pose de **192** na estrutura 6QM7. Os átomos de carbono, enxofre, nitrogênio e oxigênio estão coloridos em preto, amarelo, azul e vermelho, respectivamente. Os átomos de hidrogênio foram omitidos para melhor clareza **b)** Fórmula estrutural de **192**. Imagem gerada com os programas DSV e Corel PHOTO-PAINT, versões 21.1.0.20298 e 22.0.0.412, respectivamente

**Fonte:** elaborado pelo autor.

Na **Figura 24**, é representado o modo de ligação da melhor pose de **222**, a qual foi calculada pela função de pontuação ChemPLP, no sítio de ligação da biomacromolécula. A subunidade benzila, de **222**, realiza um empilhamento- $\pi$  com a cadeia lateral de F24 (4,57 Å), forma uma interação  $\pi$ -alquila com a cadeia lateral de V227 (4,63 Å) e constitui uma ligação de hidrogênio não-clássica com a hidroxila de

Y212 (3,49 Å). Um dos átomos de nitrogênio, da subunidade tiouréia, o qual está conectado diretamente à subunidade benzila, realiza uma ligação de hidrogênio com o átomo de nitrogênio de G228 (3,10 Å). O átomo de oxigênio carbonílico, do ligante, estabelece uma ligação de hidrogênio com o átomo de nitrogênio do resíduo G146 (2,77 Å). A subunidade metoxifenila constitui uma ligação de hidrogênio não-clássica com o átomo de oxigênio, da cadeia lateral, de S229 (4,06 Å) e, adicionalmente, forma uma ligação de hidrogênio com o resíduo catalítico de T100 (2,99 Å).

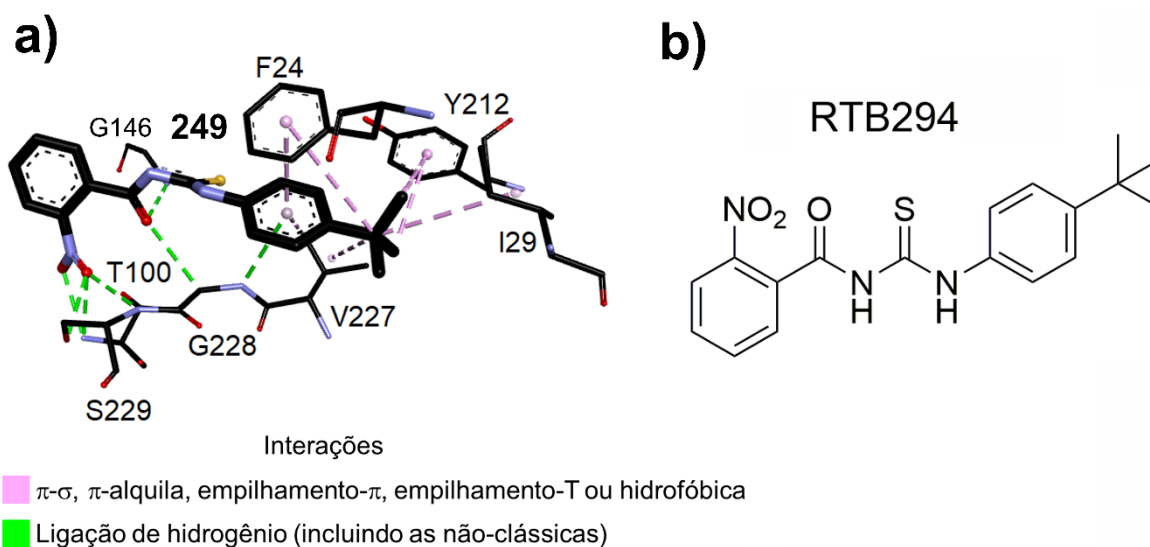


**Figura 24** — **a)** Modo de ligação da melhor pose de **222** na estrutura 6QM7. Os átomos de carbono, enxofre, nitrogênio e oxigênio estão coloridos em preto, amarelo, azul e vermelho, respectivamente. Os átomos de hidrogênio foram omitidos para melhor clareza **b)** Fórmula estrutural de **222**. Imagem gerada com os programas DSV e Corel PHOTO-PAINT, versões 21.1.0.20298 e 22.0.0.412, respectivamente

**Fonte:** elaborado pelo autor.

O modo de ligação da pose, de maior valor de pontuação, do ligante **249**, a qual foi obtida pela função de pontuação ChemPLP, é ilustrado na **Figura 25**. O grupo terc-butila, de **249**, estabelece duas interações hidrofóbicas com átomos, da cadeia lateral, dos resíduos I29 (4,73 Å) e V227 (4,34 Å), realiza duas interações  $\pi$ - $\sigma$  e uma  $\pi$ -alquila com a cadeia lateral de Y212 (3,93 Å, 3,93 Å e 4,49 Å, respectivamente) e forma uma interação  $\pi$ -alquila com a cadeia lateral de F24 (4,83 Å). O anel aromático, do grupo terc-butilbenzeno, realiza um empilhamento- $\pi$  com a cadeia lateral de F24 (3,72 Å), forma uma interação  $\pi$ - $\sigma$  com a cadeia lateral de V227 (3,73 Å) e, adicionalmente, uma ligação de hidrogênio não-clássica, do tipo  $\pi$ -doador, com o átomo de nitrogênio de G228 (3,49 Å). O átomo de enxofre, da subunidade tiouréia, constitui uma ligação

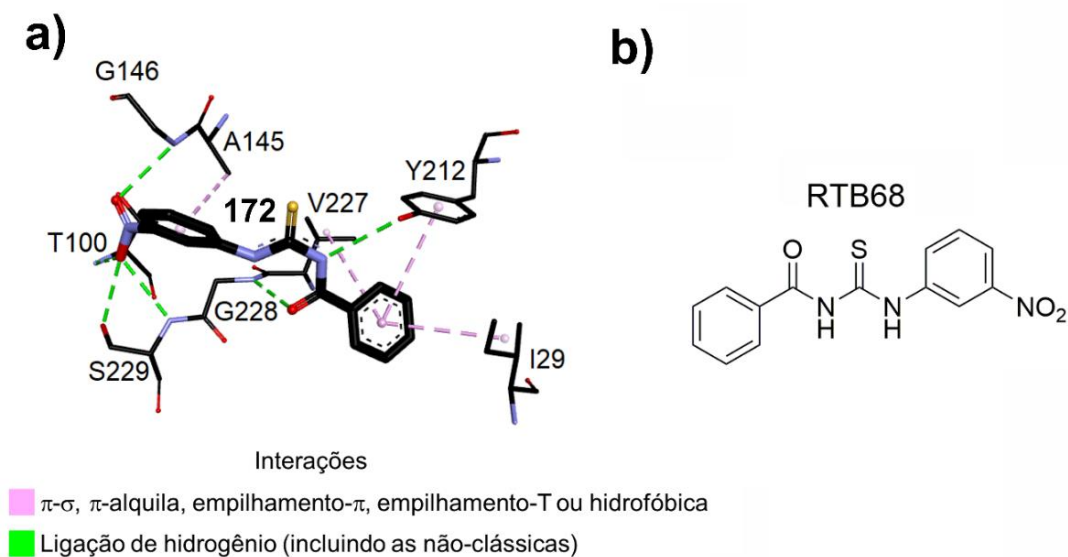
de hidrogênio com o átomo de nitrogênio de G146 (3,56 Å). O átomo de oxigênio carbonílico, do ligante, participa de duas ligações de hidrogênio, sendo uma com o átomo de nitrogênio de G146 (2,90 Å) e outra, não-clássica, com o átomo de carbono, da espinha dorsal, de G228 (3,45 Å). A posição do grupo nitro, do ligante, favorece quatro ligações de hidrogênio, sendo duas com o resíduo catalítico de T100 (2,73 Å e 2,82 Å) e outras duas com o resíduo S229 (2,78 Å e 3,26 Å).



**Figura 25** — **a)** Modo de ligação da melhor pose de **249** na estrutura 6QM7. Os átomos de carbono, enxofre, nitrogênio e oxigênio estão coloridos em preto, amarelo, azul e vermelho, respectivamente. Os átomos de hidrogênio foram omitidos para melhor clareza **b)** Fórmula estrutural de **249**. Imagem gerada com os programas DSV e Corel PHOTO-PAINT, versões 21.1.0.20298 e 22.0.0.412, respectivamente

**Fonte:** elaborado pelo autor.

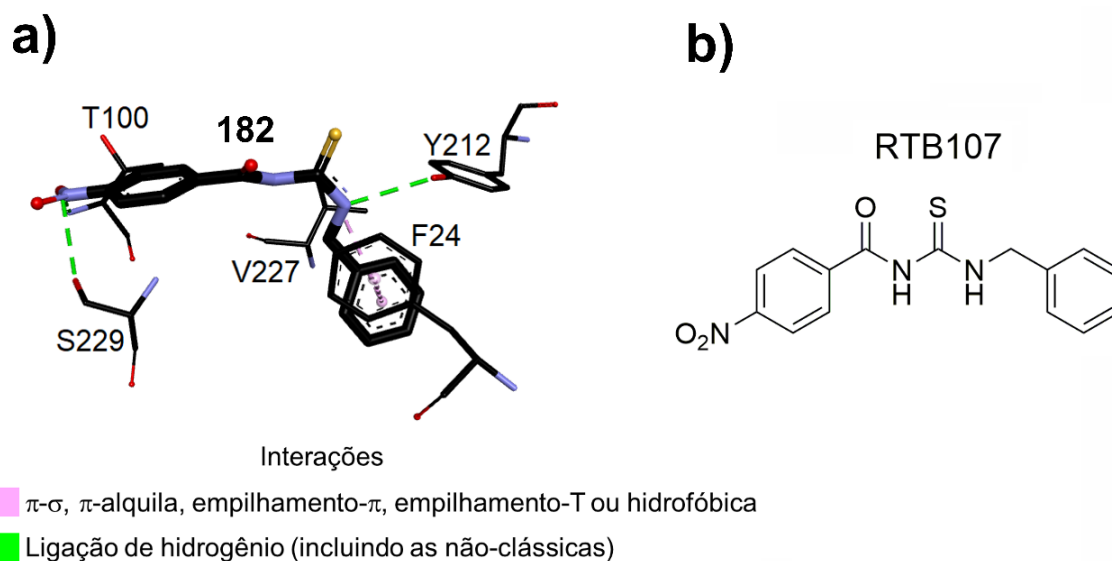
Na **Figura 26**, estão representadas as interações estabilizantes da pose, de maior valor de pontuação, de **172**, a qual foi estimada pela função de pontuação ChemPLP, no sítio de ligação do receptor. A subunidade fenila, de **172**, realiza duas interações  $\pi$ -alquila com a cadeia lateral de cada um dos resíduos I29 (4,67 Å) e V227 (4,66 Å), além disso, estabelece um empilhamento-T com a cadeia lateral de Y212 (4,96 Å). O átomo de oxigênio carbonílico, do ligante, constitui uma ligação de hidrogênio com o átomo de nitrogênio de G228 (3,01 Å). Um dos átomos de nitrogênio da subunidade tiouréia forma uma ligação de hidrogênio com o átomo de oxigênio, da cadeia lateral, de Y212 (3,30 Å). O anel aromático, da subunidade nitrofenila, constitui uma interação  $\pi$ -alquila com a cadeia lateral de A145 (4,86 Å). **172** participa de quatro ligações de hidrogênio envolvendo o grupo nitro e os seguintes resíduos de aminoácidos: G146 (3,07 Å), S229 (2,98 Å e 3,10 Å) e T100 (2,97 Å).



**Figura 26** — **a)** Modo de ligação da melhor pose de **172** na estrutura 6QM7. Os átomos de carbono, enxofre, nitrogênio e oxigênio estão coloridos em preto, amarelo, azul e vermelho, respectivamente. Os átomos de hidrogênio foram omitidos para melhor clareza **b)** Fórmula estrutural de **172**. Imagem gerada com os programas DSV e Corel PHOTO-PAINT, versões 21.1.0.20298 e 22.0.0.412, respectivamente

**Fonte:** elaborado pelo autor.

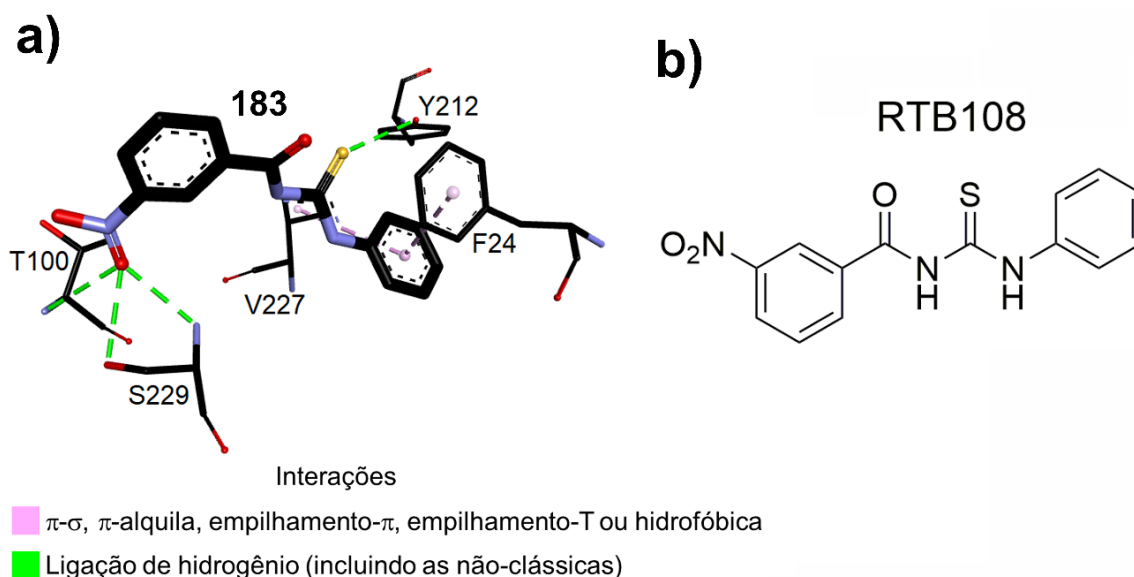
O modo de ligação da melhor pose de **182**, a qual foi calculada pela função de pontuação ChemPLP, no sítio de ligação da estrutura 6QM7 é ilustrado pela **Figura 27**.



**Figura 27** — **a)** Modo de ligação da melhor pose de **182** na estrutura 6QM7. Os átomos de carbono, enxofre, nitrogênio e oxigênio estão coloridos em preto, amarelo, azul e vermelho, respectivamente. Os átomos de hidrogênio foram omitidos para melhor clareza **b)** Fórmula estrutural de **182**. Imagem gerada com os programas DSV e Corel PHOTO-PAINT, versões 21.1.0.20298 e 22.0.0.412, respectivamente

**Fonte:** elaborado pelo autor.

Por meio da **Figura 28**, é demonstrado o modo de ligação da pose, de maior valor de pontuação, do ligante **183**, a qual foi obtida pela função de pontuação ChemPLP. A subunidade fenila realiza um empilhamento- $\pi$  com a cadeia lateral de F24 (4,25 Å) e, adicionalmente, uma interação  $\pi$ -alquila com a cadeia lateral de V227 (4,55 Å). O átomo de enxofre, da subunidade tiouréia, estabelece uma ligação de hidrogênio com o átomo de oxigênio, da cadeia lateral, de Y212 (3,16 Å). Um dos átomos de oxigênio, do grupo nitro, estabelece três ligações de hidrogênio, sendo uma com o átomo de nitrogênio do resíduo catalítico de T100 (2,99 Å) e duas com os átomos de nitrogênio e oxigênio do resíduo S229 (2,78 Å e 2,82 Å, respectivamente).

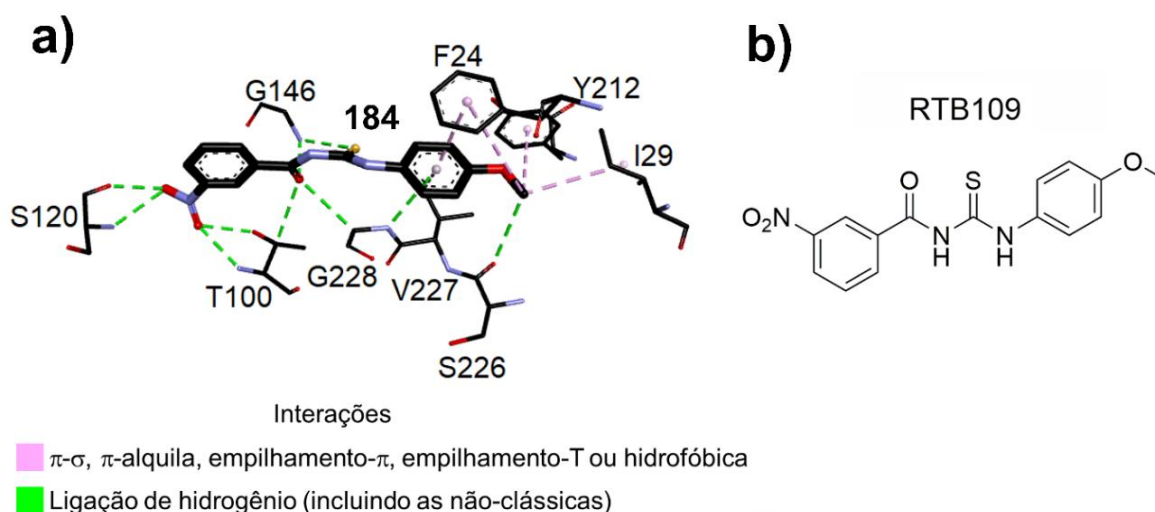


**Figura 28** — a) Modo de ligação da melhor pose de **183** na estrutura 6QM7. Os átomos de carbono, enxofre, nitrogênio e oxigênio estão coloridos em preto, amarelo, azul e vermelho, respectivamente. Os átomos de hidrogênio foram omitidos para melhor clareza b) Fórmula estrutural de **183**. Imagem gerada com os programas DSV e Corel PHOTO-PAINT, versões 21.1.0.20298 e 22.0.0.412, respectivamente

**Fonte:** elaborado pelo autor.

O modo de ligação da pose, de maior valor de pontuação, do ligante **184**, a qual foi calculada pela função de pontuação ChemPLP, é representado por meio da **Figura 29**. A subunidade metoxila participa de duas interações  $\pi$ -alquila com a cadeia lateral dos resíduos Y212 (4,68 Å) e F14 (4,97 Å), também constitui uma interação hidrofóbica com a cadeia lateral de I29 (4,18 Å) e, adicionalmente, uma ligação de hidrogênio não-clássica com o átomo de oxigênio carbonílico de S226 (3,47 Å). O anel aromático, do grupo nitrobenzeno, forma um empilhamento- $\pi$  com a cadeia lateral de

F24 (3,70 Å), estabelece uma interação  $\pi$ - $\sigma$  com a cadeia lateral de V227 (3,74 Å) e, ademais, constitui uma ligação de hidrogênio não-clássica, do tipo  $\pi$ -doador, com o átomo de nitrogênio de G228 (3,45 Å). O átomo de enxofre, da subunidade tiouréia, realiza uma ligação de hidrogênio com o átomo de nitrogênio de G146 (3,34 Å). O átomo de oxigênio carbonílico, do ligante, participa de uma ligação de hidrogênio com o átomo de nitrogênio de G146 (2,69 Å) e duas, não-clássicas, sendo uma com o átomo de carbono, da espinha dorsal, de G228 (3,46 Å) e outra com o átomo de carbono, da cadeia lateral, do resíduo catalítico de T100 (3,41 Å). Os átomos de oxigênio, do grupo nitro, estabelecem três ligações de hidrogênio, sendo duas com o resíduo catalítico de T100 (2,79 Å e 2,85 Å) e uma com o átomo de nitrogênio de S120 (3,01 Å).



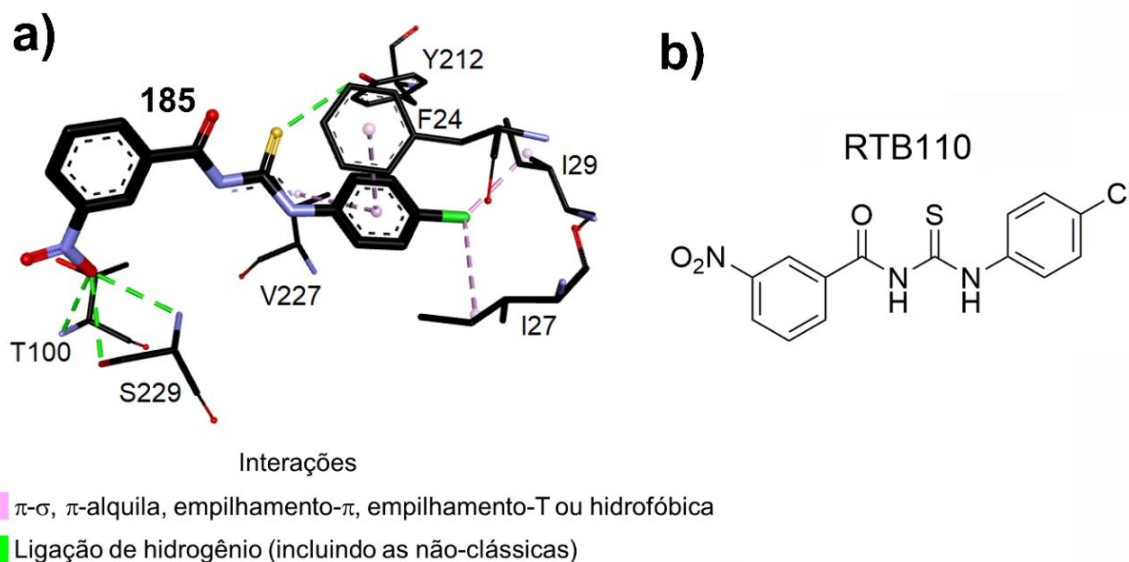
**Figura 29** — **a)** Modo de ligação da melhor pose de **184** na estrutura 6QM7. Os átomos de carbono, enxofre, nitrogênio e oxigênio estão coloridos em preto, amarelo, azul e vermelho, respectivamente. Os átomos de hidrogênio foram omitidos para melhor clareza **b)** Fórmula estrutural de **184**. Imagem gerada com os programas DSV e Corel PHOTO-PAINT, versões 21.1.0.20298 e 22.0.0.412, respectivamente

**Fonte:** elaborado pelo autor.

Na **Figura 30**, está representado o modo de ligação da pose, de maior valor de pontuação, de **185**, a qual foi estimada pela função de pontuação ChemPLP, no sítio de ligação da proteína. O átomo de cloro participa de duas interações hidrofóbicas com a cadeia lateral de cada um dos seguintes resíduos de aminoácidos: I27 (4,82 Å) e I29 (3,11 Å). O anel aromático, da subunidade clorofenila, realiza um empilhamento- $\pi$  com a cadeia lateral de F24 (4,18 Å) e, adicionalmente, estabelece uma interação  $\pi$ -alquila com a cadeia lateral de V227 (4,50 Å). O átomo de enxofre, da subunidade



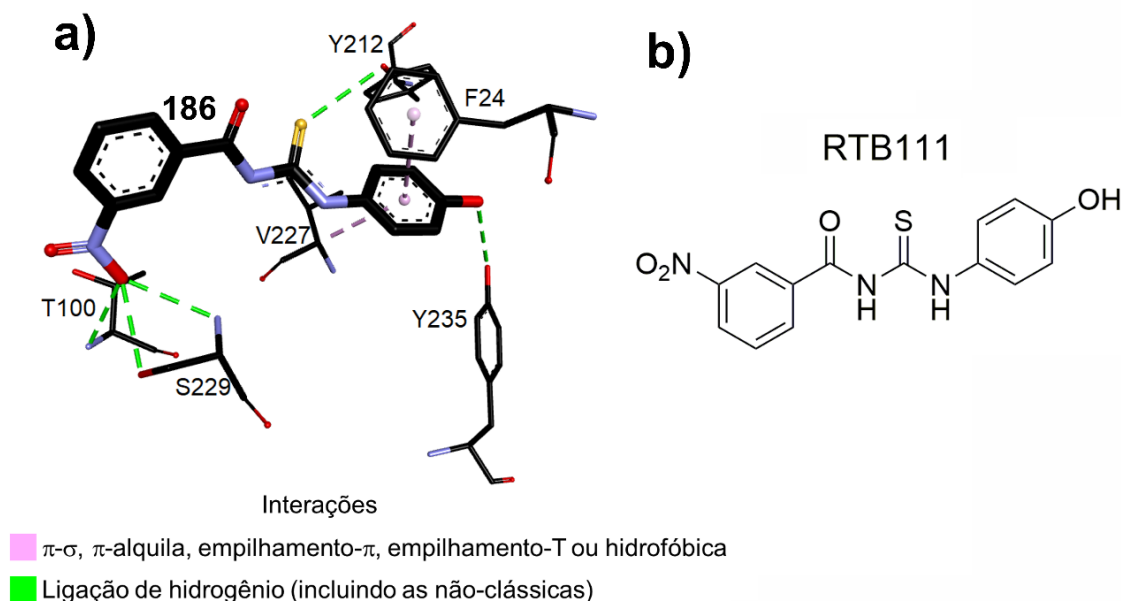
tiouréia, forma uma ligação de hidrogênio com o átomo de oxigênio da cadeia lateral de Y212 (3,55 Å). Um dos átomos de oxigênio, do grupo nitro, está envolvido em três ligações de hidrogênio, sendo uma com o átomo de nitrogênio do resíduo catalítico de T100 (2,94 Å) e duas com o átomo de oxigênio, da cadeia lateral, e de nitrogênio do resíduo S229 (2,91 Å e 3,10 Å, respectivamente).



**Figura 30** — **a)** Modo de ligação da melhor pose de **185** na estrutura 6QM7. Os átomos de carbono, cloro, enxofre, nitrogênio e oxigênio estão coloridos em preto, verde, amarelo, azul e vermelho, respectivamente. Os átomos de hidrogênio foram omitidos para melhor clareza **b)** Fórmula estrutural de **185**. Imagem gerada com os programas DSV e Corel PHOTO-PAINT, versões 21.1.0.20298 e 22.0.0.412, respectivamente

**Fonte:** elaborado pelo autor.

A melhor pose ranqueada pela função de pontuação ChemPLP de **186**, bem como as interações do referido ligante com resíduos de aminoácidos do sítio de ligação do receptor estão ilustrados na **Figura 31**. A hidroxila, do ligante, realiza uma ligação de hidrogênio com o átomo de oxigênio, da cadeia lateral, de Y235 (3,39 Å). O anel aromático, da subunidade hidroxifenila, forma um empilhamento- $\pi$  com a cadeia lateral de F24 (4,26 Å) e interage, por meio de uma interação  $\pi$ - $\sigma$  com o átomo de carbono, da espinha dorsal, de V227 (3,93 Å). O átomo de enxofre, da subunidade tiouréia, constitui uma ligação de hidrogênio com o átomo de oxigênio, da cadeia lateral, de Y212 (3,52 Å). A posição do grupo nitro, do ligante, favorece três ligações de hidrogênio, sendo uma com o átomo de nitrogênio do resíduo catalítico de T100 (2,06 Å) e duas com o átomo de oxigênio, da cadeia lateral, e de nitrogênio do resíduo S229 (2,94 Å e 3,10 Å, respectivamente).

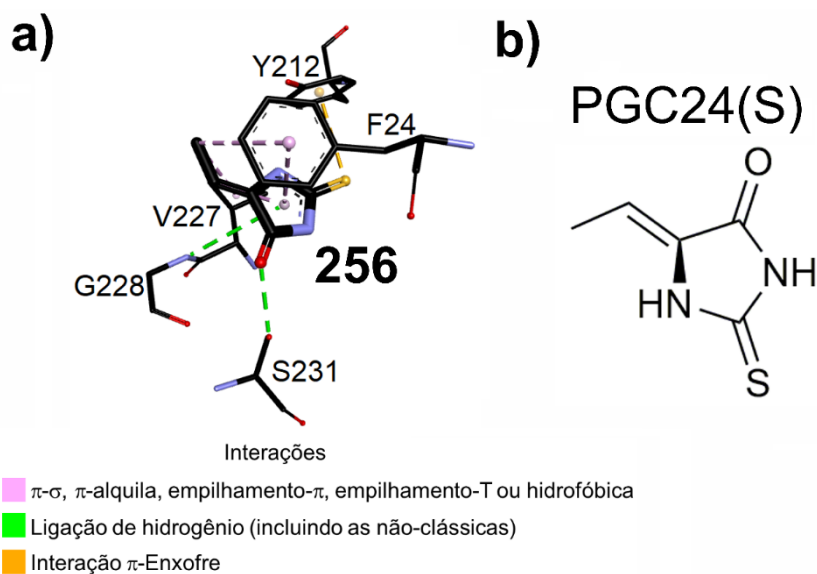


**Figura 31** — **a)** Modo de ligação da melhor pose de **186** na estrutura 6QM7. Os átomos de carbono, enxofre, nitrogênio e oxigênio estão coloridos em preto, amarelo, azul e vermelho, respectivamente. Os átomos de hidrogênio foram omitidos para melhor clareza **b)** Fórmula estrutural de **186**. Imagem gerada com os programas DSV e Corel PHOTO-PAINT, versões 21.1.0.20298 e 22.0.0.412, respectivamente

**Fonte:** elaborado pelo autor.

#### 4.2.3 As 10 melhores poses eleitas de ligantes com padrão estrutural tiohidantoína

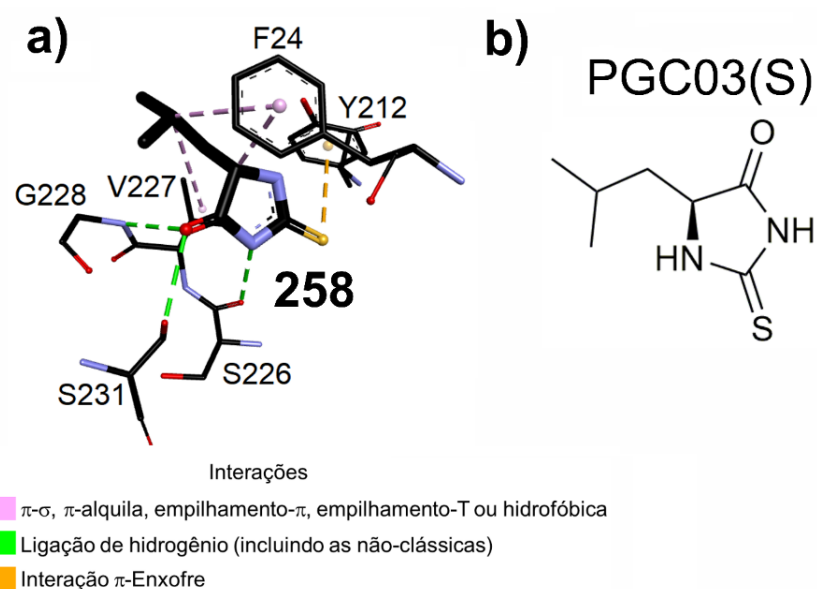
O modo de ligação da pose, de maior valor de pontuação, de **256**, a qual foi ranqueada pela função de pontuação ChemPLP, no sítio de ligação do receptor, é ilustrado pela **Figura 32**. A subunidade imidazolidina, de **256**, realiza um empilhamento- $\pi$  com a cadeia lateral de F24 (4,21 Å), forma uma interação  $\pi$ - $\sigma$  com o átomo de carbono, da cadeia lateral, de V227 (3,92 Å) e, adicionalmente, constitui uma ligação de hidrogênio não-clássica, do tipo  $\pi$ -doador, com o átomo de nitrogênio de G228 (4,07 Å). O átomo de oxigênio carbonílico, do ligante, realiza uma ligação de hidrogênio com o átomo de oxigênio, da cadeia lateral, de S231 (2,61 Å). O átomo de enxofre, de **256**, interage com o anel aromático da cadeia lateral de Y212 por meio de uma interação  $\pi$ -enxofre (3,59 Å). O átomo de carbono, do grupo propeno, participa de duas interações, sendo uma  $\pi$ -alquila com a cadeia lateral de F24 (4,50 Å) e outra, hidrofóbica, com o átomo de carbono, da cadeia lateral, de V227 (4,31 Å).



**Figura 32** — **a)** Modo de ligação da melhor pose de **256** na estrutura 6QM7. Os átomos de carbono, enxofre, nitrogênio e oxigênio estão coloridos em preto, amarelo, azul e vermelho, respectivamente. Os átomos de hidrogênio foram omitidos para melhor clareza **b)** Fórmula estrutural de **256**. Imagem gerada com os programas DSV e Corel PHOTO-PAINT, versões 21.1.0.20298 e 22.0.0.412, respectivamente

**Fonte:** elaborado pelo autor.

A pose melhor ranqueada pela função de pontuação de pontuação ChemPLP de **258**, bem como as interações entre o referido ligante e resíduos de aminoácidos do sítio de ligação são demonstrados pela **Figura 33**.

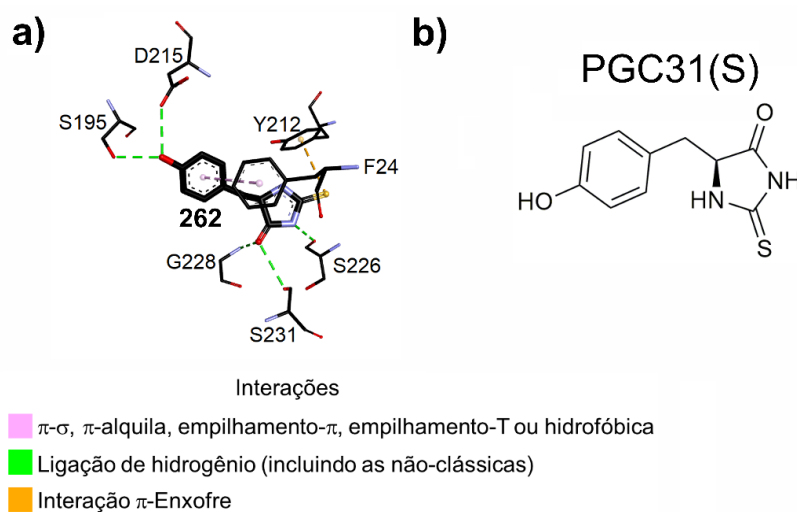


**Figura 33** — **a)** Modo de ligação da melhor pose de **258** na estrutura 6QM7. Os átomos de carbono, enxofre, nitrogênio e oxigênio estão coloridos em preto, amarelo, azul e vermelho, respectivamente. Os átomos de hidrogênio foram omitidos para melhor clareza **b)** Fórmula estrutural de **258**. Imagem gerada com os programas DSV e Corel PHOTO-PAINT, versões 21.1.0.20298 e 22.0.0.412, respectivamente

**Fonte:** elaborado pelo autor.

Um dos átomos de nitrogênio, da subunidade imidazolidina, realiza uma ligação de hidrogênio com o átomo de oxigênio, da ligação peptídica, de S226 (2,73 Å). O átomo de carbono carbonílico, do ligante, estabelece duas ligações de hidrogênio, sendo uma com o átomo de nitrogênio de G228 (2,86 Å) e outra com a hidroxila de S231 (2,87 Å). O átomo de enxofre, do ligante, forma uma interação  $\pi$ -enxofre com a cadeia lateral de Y212 (3,92 Å). O átomo de carbono, da subunidade imidazolidina, interage com a cadeia lateral de F24 por meio de uma interação  $\pi$ - $\sigma$  (3,44 Å). A posição do grupo isopropila, do ligante, favorece uma interação hidrofóbica com a cadeia lateral de V227 (4,70 Å) e outra, do tipo  $\pi$ -alquila, com a cadeia lateral de F24 (4,28 Å).

Na **Figura 34**, são demonstradas as interações entre resíduos de aminoácidos que constituem o sítio de ligação da enzima e a melhor pose de **262**, a qual foi calculada pela função de pontuação ChemPLP.



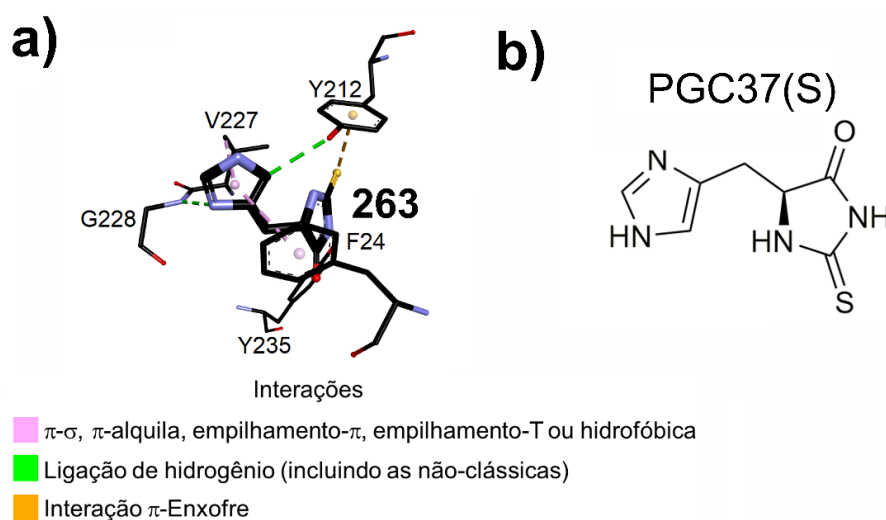
**Figura 34** — **a)** Modo de ligação da melhor pose de **262** na estrutura 6QM7. Os átomos de carbono, enxofre, nitrogênio e oxigênio estão coloridos em preto, amarelo, azul e vermelho, respectivamente. Os átomos de hidrogênio foram omitidos para melhor clareza **b)** Fórmula estrutural de **262**. Imagem gerada com os programas DSV e Corel PHOTO-PAINT, versões 21.1.0.20298 e 22.0.0.412, respectivamente

**Fonte:** elaborado pelo autor.

Um dos átomos de nitrogênio, da subunidade imidazolidina, realiza uma ligação de hidrogênio com o átomo de oxigênio, da ligação peptídica, de S226 (3,04 Å). O átomo de oxigênio carbonílico, de **262**, participa de duas ligações de hidrogênio, sendo uma com o átomo de nitrogênio de G228 (2,82 Å) e outra com o átomo de

oxigênio, da cadeia lateral, do resíduo S231 (3,11 Å). O átomo de enxofre, do ligante, realiza uma interação  $\pi$ -enxofre com a cadeia lateral de Y212 (4,02 Å). O anel aromático, do grupo hidroxifenila, estabelece um empilhamento- $\pi$  com a cadeia lateral de F24 (4,85 Å). Ademais, o átomo de oxigênio da hidroxila, de **262**, realiza uma ligação de hidrogênio com os átomos de oxigênio, da cadeia lateral, dos resíduos D215 (3,00 Å) e S195 (2,97 Å).

A pose, de maior valor de pontuação, de **263**, a qual foi obtida pela função de pontuação ChemPLP, no sítio de ligação do receptor, é representada por meio da **Figura 35**.

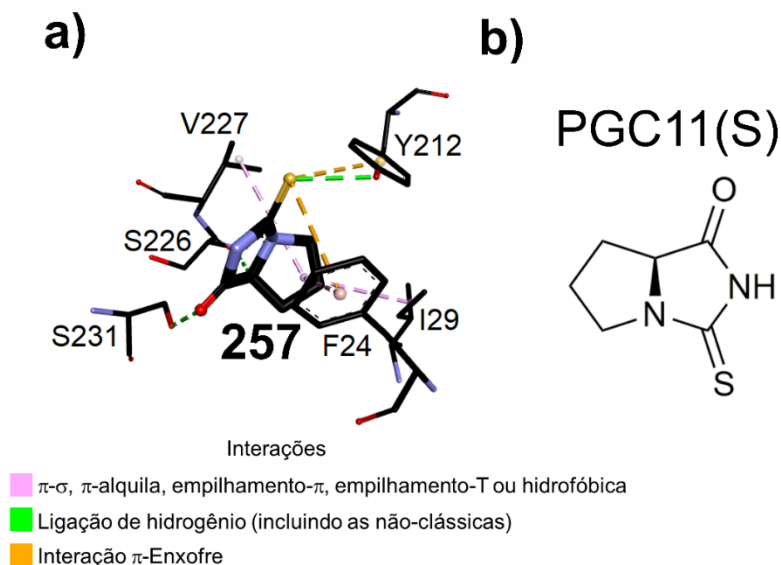


**Figura 35** — a) Modo de ligação da melhor pose de **263** na estrutura 6QM7. Os átomos de carbono, enxofre, nitrogênio e oxigênio estão coloridos em preto, amarelo, azul e vermelho, respectivamente. Os átomos de hidrogênio foram omitidos para melhor clareza b) Fórmula estrutural de **263**. Imagem gerada com os programas DSV e Corel PHOTO-PAINT, versões 21.1.0.20298 e 22.0.0.412, respectivamente

**Fonte:** elaborado pelo autor.

O átomo de nitrogênio, da subunidade imidazolidina, realiza uma ligação de hidrogênio com a hidroxila de Y235 (3,00 Å). O átomo de enxofre, do ligante, estabelece uma interação  $\pi$ -enxofre com a cadeia lateral de Y212 (3,66 Å). A subunidade imidazola, de **263**, forma um empilhamento- $\pi$  com a cadeia lateral de F24 (3,98 Å), realiza uma interação  $\pi$ - $\sigma$  com o átomo de carbono, da cadeia lateral, de V227 (3,31 Å) e, adicionalmente, constitui duas ligações de hidrogênio, sendo uma com a hidroxila de Y212 (2,76 Å) e outra com o átomo de nitrogênio de G228 (2,75 Å).

O modo de ligação da pose, de maior valor de pontuação, de **257**, a qual foi ranqueada pela função de pontuação ChemPLP, é ilustrado pela **Figura 36**.



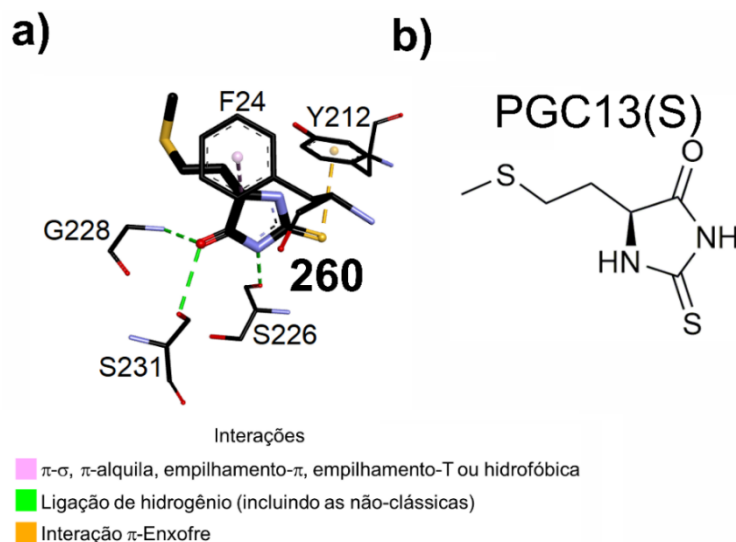
**Figura 36** — a) Modo de ligação da melhor pose de **257** na estrutura 6QM7. Os átomos de carbono, enxofre, nitrogênio e oxigênio estão coloridos em preto, amarelo, azul e vermelho, respectivamente. Os átomos de hidrogênio foram omitidos para melhor clareza b) Fórmula estrutural de **257**. Imagem gerada com os programas DSV e Corel PHOTO-PAINT, versões 21.1.0.20298 e 22.0.0.412, respectivamente

**Fonte:** elaborado pelo autor.

O átomo de oxigênio carbonílico, de **257**, realiza uma ligação de hidrogênio com a hidroxila de S231 (2,48 Å). O átomo de enxofre, do ligante, forma uma ligação de hidrogênio com o átomo de oxigênio, da cadeia lateral, de Y212 (2,88 Å) e, adicionalmente, estabelece duas interações  $\pi$ -enxofre com a cadeia lateral dos seguintes resíduos de aminoácidos: F24 (4,04 Å) e Y212 (4,76 Å). A posição da subunidade bicíclica, do ligante, favorece duas interações hidrofóbicas com a cadeia lateral dos resíduos V227 (4,89 Å) e I29 (4,77 Å) e também uma interação  $\pi$ -alquila, com a cadeia lateral de F24 (4,30 Å). Ademais, a referida subunidade realiza uma ligação de hidrogênio não-clássica com o átomo de oxigênio carbonílico de S226 (3,28 Å).

Na **Figura 37**, é demonstrado o modo de ligação da melhor pose de **260**, a qual foi estimada pela função de pontuação ChemPLP. Um dos átomos de nitrogênio, da subunidade imidazolidina, forma uma ligação de hidrogênio com o átomo de oxigênio de S226 (2,53 Å). O átomo de oxigênio carbonílico, de **260**, realiza duas ligações de hidrogênio, sendo uma com a hidroxila de S231 (2,85 Å) e outra com o átomo de nitrogênio de G228 (2,97 Å). O átomo de enxofre, do ligante, o qual está diretamente ligado à subunidade imidazolidina, estabelece uma interação  $\pi$ -enxofre com o anel aromático, da cadeia lateral, do resíduo Y212 (3,79 Å). Um dos átomos de carbono,

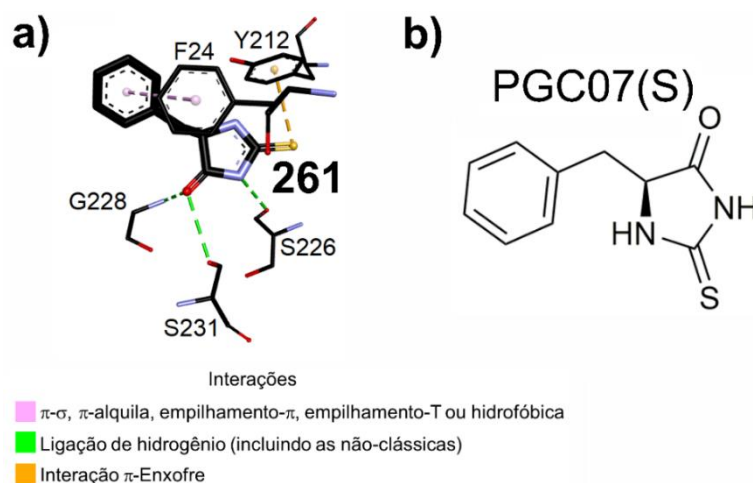
da subunidade imidazolidina, interage com a cadeia lateral de F24 (3,29 Å) por meio de uma interação  $\pi$ - $\sigma$ .



**Figura 37** — **a)** Modo de ligação da melhor pose de **260** na estrutura 6QM7. Os átomos de carbono, enxofre, nitrogênio e oxigênio estão coloridos em preto, amarelo, azul e vermelho, respectivamente. Os átomos de hidrogênio foram omitidos para melhor clareza **b)** Fórmula estrutural de **260**. Imagem gerada com os programas DSV e Corel PHOTO-PAINT, versões 21.1.0.20298 e 22.0.0.412, respectivamente

**Fonte:** elaborado pelo autor.

As interações entre resíduos de aminoácidos do sítio de ligação da estrutura 6QM7 e a pose, de maior valor de pontuação, de **261**, a qual foi obtida pela função de pontuação ChemPLP, são ilustradas pela **Figura 38**.

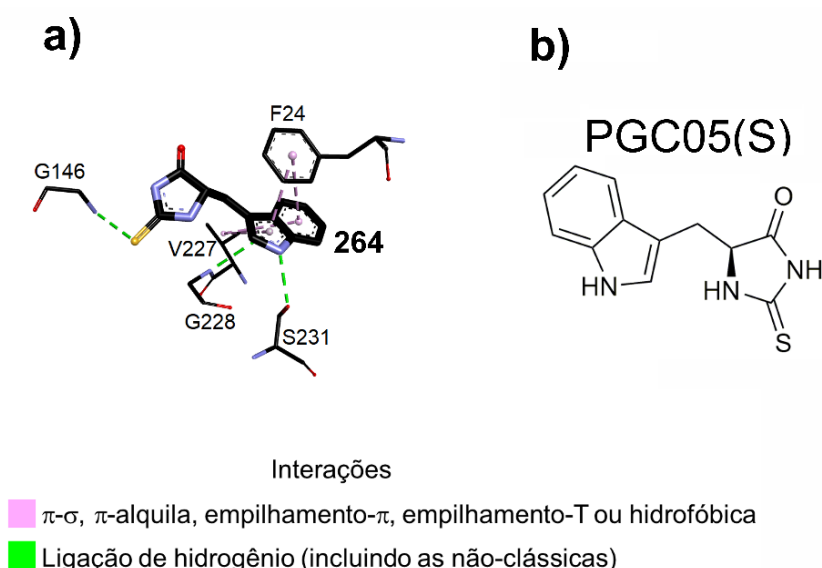


**Figura 38** — **a)** Modo de ligação da melhor pose de **261** na estrutura 6QM7. Os átomos de carbono, enxofre, nitrogênio e oxigênio estão coloridos em preto, amarelo, azul e vermelho, respectivamente. Os átomos de hidrogênio foram omitidos para melhor clareza **b)** Fórmula estrutural de **261**. Imagem gerada com os programas DSV e Corel PHOTO-PAINT, versões 21.1.0.20298 e 22.0.0.412, respectivamente

**Fonte:** elaborado pelo autor.

Um dos átomos de nitrogênio, da subunidade imidazolidina, realiza uma ligação de hidrogênio com o átomo de oxigênio, da ligação peptídica, de S226 (2,99 Å). O átomo de oxigênio carbonílico, do ligante, estabelece duas ligações de hidrogênio, sendo uma com o átomo de oxigênio, da cadeia lateral, de S231 (3,09 Å) e outra com o átomo de nitrogênio do resíduo G228 (2,82 Å). A posição do anel aromático, da subunidade benzila, favorece um empilhamento- $\pi$  com a cadeia lateral de F24 (4,85 Å). O átomo de enxofre, de **261**, constitui uma interação  $\pi$ -enxofre com a cadeia lateral de Y212 (4,04 Å).

O modo de ligação da pose melhor ranqueada pela função de pontuação ChemPLP de **264** é ilustrado pela **Figura 39**.



**Figura 39** — **a)** Modo de ligação da melhor pose de **264** na estrutura 6QM7. Os átomos de carbono, enxofre, nitrogênio e oxigênio estão coloridos em preto, amarelo, azul e vermelho, respectivamente. Os átomos de hidrogênio foram omitidos para melhor clareza **b)** Fórmula estrutural de **264**. Imagem gerada com os programas DSV e Corel PHOTO-PAINT, versões 21.1.0.20298 e 22.0.0.412, respectivamente

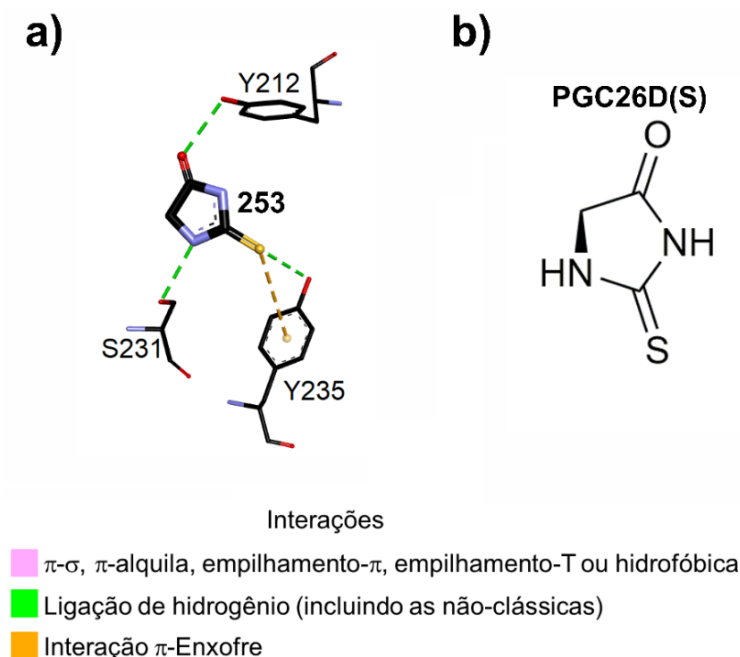
**Fonte:** elaborado pelo autor.

A subunidade indola, de **264**, estabelece dois empilhamentos- $\pi$  com a cadeia lateral de F24 (3,94 Å e 4,46 Å), realiza duas ligações de hidrogênio, sendo uma com o átomo de oxigênio, da cadeia lateral, de S231 (2,64 Å) e outra, não-clássica, do tipo  $\pi$ -doador, com o átomo de nitrogênio de G228 (3,55 Å). Ademais, a referida subunidade constitui duas interações  $\pi$ -alquila com átomos, da cadeia lateral, de V227



(4,57 Å e 4,61 Å). O átomo de enxofre, do ligante, forma uma ligação de hidrogênio com o átomo de nitrogênio de G146 (3,17 Å).

A **Figura 40** representa o modo de ligação da pose, de maior valor de pontuação, de **253**, a qual foi calculada pela função de pontuação ChemPLP.

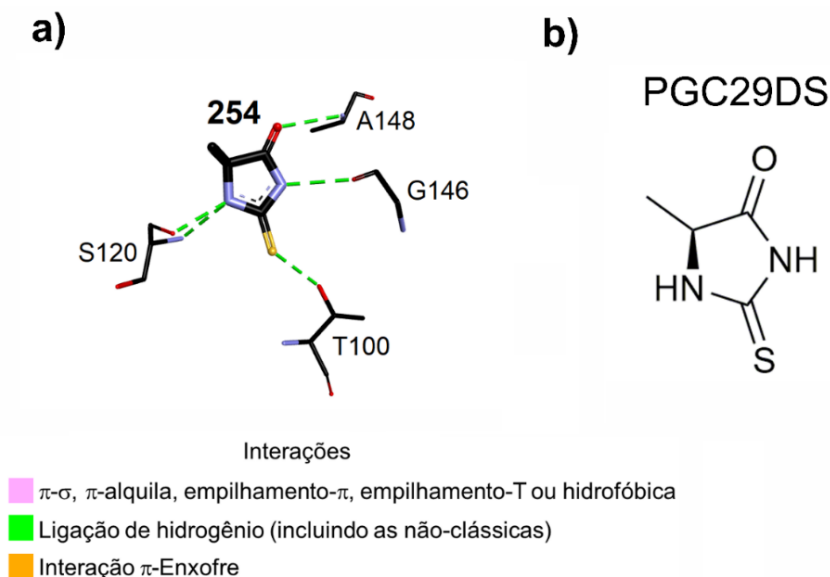


**Figura 40** — a) Modo de ligação da melhor pose de **253** na estrutura 6QM7. Os átomos de carbono, enxofre, nitrogênio e oxigênio estão coloridos em preto, amarelo, azul e vermelho, respectivamente. Os átomos de hidrogênio foram omitidos para melhor clareza b) Fórmula estrutural de **253**. Imagem gerada com os programas DSV e Corel PHOTO-PAINT, versões 21.1.0.20298 e 22.0.0.412, respectivamente  
**Fonte:** elaborado pelo autor.

Um dos átomos de nitrogênio, do ligante, realiza uma ligação de hidrogênio com a hidroxila de S231 (2,97 Å). O átomo de enxofre, de **253**, estabelece duas interações com a cadeia lateral do resíduo Y235, sendo uma ligação de hidrogênio (3,62 Å) e uma interação  $\pi$ -enxofre (4,84 Å). O átomo de oxigênio, do ligante, forma uma ligação de hidrogênio com o átomo de oxigênio, da cadeia lateral, de Y212 (2,85 Å).

O modo de ligação da pose, de maior valor de pontuação, de **254**, calculada pela função de pontuação ChemPLP, é demonstrado pela **Figura 41**. Os átomos de nitrogênio, do ligante, participam de três ligações de hidrogênio, a saber: uma com o átomo de oxigênio carbonílico de G146 (2,87 Å) e duas com o resíduo S120, sendo uma com o átomo de oxigênio carbonílico (2,74 Å) e outra com o átomo de nitrogênio do referido resíduo de aminoácido (3,11 Å). O átomo de oxigênio carbonílico, de **254**, forma uma ligação de hidrogênio com o átomo de nitrogênio de A148 (2,97 Å). O

átomo de enxofre, do ligante, constitui uma ligação de hidrogênio com o átomo de oxigênio, da cadeia lateral, do resíduo catalítico de T100 (3,00 Å).



**Figura 41** — **a)** Modo de ligação da melhor pose de **254** na estrutura 6QM7. Os átomos de carbono, enxofre, nitrogênio e oxigênio estão coloridos em preto, amarelo, azul e vermelho, respectivamente. Os átomos de hidrogênio foram omitidos para melhor clareza **b)** Fórmula estrutural de **254**. Imagem gerada com os programas DSV e Corel PHOTO-PAINT, versões 21.1.0.20298 e 22.0.0.412, respectivamente  
**Fonte:** elaborado pelo autor.

O **Quadro 8** ilustra as interações entre os resíduos de aminoácidos chave e as 10 tio-hidantoínas eleitas.

	F24	G228	S195	T100	V227	Y212
<b>256</b>						
<b>258</b>						
<b>262</b>						
<b>263</b>						
<b>257</b>						
<b>260</b>						
<b>261</b>						
<b>264</b>						
<b>253</b>						
<b>254</b>						

Legenda interações

- $\pi$ - $\sigma$ ,  $\pi$ -alquila, empilhamento- $\pi$ , empilhamento-T ou hidrofóbica
- $\pi$ -Enxofre
- Ligação de hidrogênio

**Quadro 8** — Interações entre as tio-hidantoínas eleitas e os resíduos de aminoácidos chave  
**Fonte:** elaborado pelo autor.

Como é possível averiguar no **Quadro 8**, **256**, **258**, **262** e **263** interagem com 4 resíduos de aminoácidos chave, enquanto que os ligantes **257**, **260**, **261** e **264** interagem com 3 resíduos chave. As tio-hidantoínas **253** e **254** interagem apenas com um resíduo de aminoácido chave, Y212 e T100, respectivamente.

## 5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

O modelo computacional da proteassoma 20S da espécie *L. tarentolae* foi adequadamente validado através da redocagem de **20** na estrutura tridimensional 6QM7.

As interações tomadas como mais importantes são as que estão presentes nos complexos (**10** e **20**)-receptor, com os resíduos F24, G228, S195, S229, T100, V227 e Y212, visto que esse é um dado experimental.

Os 10 melhores ligantes eleitos dos conjuntos derivados aminoacídicos e benzoiltiouréia se ajustam bem ao sítio de ligação, interagindo tanto com resíduos presentes no bolsão hidrofóbico, como, por exemplo, o resíduo F24, quanto com resíduos situados na região polar do sítio de ligação, como, por exemplo, o resíduo catalítico T100.

As 10 melhores tio-hidantoínas eleitas limitam-se à região do bolsão hidrofóbico, interagindo, principalmente, com os resíduos F24 e V227.

Como perspectivas desse trabalho, incluem-se a síntese, isolamento, purificação e caracterização estrutural dos derivados aminoacídicos, benzoiltiouréias e tio-hidantoínas eleitos, para serem submetidos a ensaios in vitro contra amastigotas da espécie *L. donovani* situados dentro de macrófagos.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, J. Proteasome inhibition in cancer: development of PS-341. *Semin. Oncol.*, v. 28, n. 6, p. 613–619, 2001.
- AKHOUNDI, M. *et al.* A historical overview of the classification, evolution, and dispersion of *Leishmania* parasites and sandflies. *PLoS Negl. Trop. Dis.*, v. 10, n. 3, p. 1-40, 2016.
- ALVAR, J.; CROFT, S.; OLLIARO, P. Chemotherapy in the treatment and control of leishmaniasis. *Adv. Parasitol.*, v. 61, n. 6, p. 223-274, 2006.
- ANDERSON, A. C. The Process of Structure-Based Drug Design. *Chem. Biol.*, v. 10, n. 9, p. 787-797, 2003.
- ANTOINE, J. C. *et al.* Parasitophorous vacuoles of *Leishmania amazonensis*-infected macrophages maintain an acidic pH. *Infect. Immun.*, v. 58, n. 3, p. 779-787, 1990.
- ANTOINE, J. C. *et al.* The biogenesis and properties of the parasitophorous vacuoles that harbour *Leishmania* in murine macrophages. *Trends Microbiol.*, v. 6, n. 10, p. 392-401, 1998.
- ANVERSA, L. *et al.* Human leishmaniasis in Brazil: A general review. *Rev. Assoc. Med. Bras.*, v. 64, n. 3, p. 281-289, 2018.
- ARENDRT, C. S.; HOCHSTRASSER, M. Identification of the yeast 20S proteasome catalytic centers and subunit interactions required for active-site formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, v. 94, n. 14, p. 7156-7161, 1997.
- BERMAN, J. D. U.S Food and Drug Administration approval of AmBisome (liposomal amphotericin B) for treatment of visceral leishmaniasis. *Clin. Infect. Dis.*, v. 28, n. 1, p. 49-51, 1999.
- BEYNON; R. J.; BOND, J. S. *Proteolytic Enzymes: A Practical Approach*. Oxônia: Editora: Oxford University Press, 1989.
- BIANCHI, M. E. DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. *J. Leukoc. Biol.*, v. 81, n. 1, p. 1-5, 2007.
- BLANCO, V. R.; NASCIMENTO-JÚNIOR, N. M. Leishmaniose: Aspectos Gerais Relacionados com a Doença, o Ciclo do Parasita, Fármacos Disponíveis, Novos Protótipos e Vacinas. *Rev. Virtual Quim.*, v. 9, n. 3, p. 861-876, 2017.
- BORISSENKO, L.; GROLL, M. 20S Proteasome and its inhibitors: Crystallographic knowledge for drug development. *Chem. Rev.*, v. 107, n. 3, p. 687-717, 2007.

BRASIL. Ministério da Saúde. Leishmaniose visceral. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z-1/l/leishmaniose-visceral>. Acesso em: 09 dez. 2020.

BRITO, T. O. *et al.* Benzoylthioureas: Design, Synthesis and Antimycobacterial Evaluation. *Med. Chem.*, v. 16, p. 93-103, 2020.

BRITTINGHAM, A. *et al.* Role of the Leishmania surface protease gp63 in complement fixation, cell adhesion, and resistance to complement-mediated lysis. *J. Immunol.*, v. 155, n. 6, p. 3102-3111, 1995.

CAMARGO, P. G. *et al.* Thiohydantoins as anti-leishmanial agents: biological evaluation and multi-target investigation by molecular docking studies. *J. Biomol. Struct. Dyn.*, p. 1-10, 2020.

CARVALHO, P. G. C. *et al.* Synthesis and Antimicrobial Activity of Thiohydantoins Obtained from L-Amino Acids. *Lett. Drug. Des. Discov.*, v. 17, p. 94-102, 2020.

CDC, Parasites — Leishmaniasis. Disponível em: <https://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/biology.html>. Acesso em: 14 out. 2019.

CHAPPUIS, F. *et al.* Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? *Nat. Rev. Microbiol.*, v. 5, n. 11, p. 873-882, 2007.

CHENG, T. *et al.* Structure-Based Virtual Screening for Drug Discovery: a Problem-Centric Review. *AAPS J.*, v. 14, n. 1, p. 133–141, 2012.

CORPAS-LÓPEZ, V. *et al.* (-)- $\alpha$ -Bisabolol, a promising oral compound for the treatment of visceral leishmaniasis. *J. Nat. Prod.*, v. 78, n. 6, p. 1202-1207, 2015.

CROFT, S. L. *et al.* The activity of alkyl phosphorylcholines and related derivatives against *Leishmania donovani*. *Biochem. Pharmacol.*, v. 36, n. 16, p. 2633–2636, 1987.

CROFT, S. L.; SNOWDON, D.; YARDLEY, V. The activities of four anticancer alkyllysophospholipids against *Leishmania donovani*, *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma brucei*. *J. Antimicrob. Chemother.*, v. 38, n. 6, p. 1041-7, 1996.

DICK, T. P. *et al.* Contribution of proteasomal beta-subunits to the cleavage of peptide substrates analyzed with yeast mutants. *J. Biol. Chem.*, v. 273, n. 41, p. 25637-46, 1998.

DIETRICH, C. *et al.* p53-dependent cell cycle arrest induced by N-acetyl-L-leuciny-L-leuciny-L-norleucinal in platelet-derived growth factor-stimulated human fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, v. 93, n. 20, p. 10815–10819, 1996.

DNDi. Visceral leishmaniasis. Disponível em: <https://dndi.org/diseases/visceral-leishmaniasis/facts/>. Acesso em: 09 ago. 2020.

ELDRIDGE, M. D. *et al.* Empirical scoring functions: I. The development of a fast empirical scoring function to estimate the binding affinity of ligands in receptor complexes. *J. Comput. Aided Mol. Des.*, v. 11, p. 425–445, 1997.

EYTAN, E. *et al.* ATP-dependent incorporation of 20S protease into the 26S complex that degrades proteins conjugated to ubiquitin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, v. 86, n. 20, p. 7751-7755, 1989.

EWING, T. J. A. *et al.* DOCK 4.0: Search strategies for automated molecular docking of flexible molecule databases. *J. Comput. Aided Mol. Des.*, v. 15, p. 411-428, 2001.

FAN, H. *et al.* Statistical Potential for Modeling and Ranking of Protein–Ligand Interactions. *J. Chem. Inf. Model.*, v. 51, p. 3078–3092, 2011.

FDA. Miltefosine approval letter. Disponível em:  
[http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda\\_docs/nda/2014/204684Orig1s000Approv.pdf](http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2014/204684Orig1s000Approv.pdf). Acesso em 09 dez. 2020.

FERREIRA, L. G. *et al.* Molecular docking and structure-based drug design strategies. *Molecules*, v. 20, n. 7, p. 13384-421, 2015.

FRIESNER, R. A. *et al.* Glide: A New Approach for Rapid, Accurate Docking and Scoring. 1. Method and Assessment of Docking Accuracy. *J. Med. Chem.*, v. 47, p. 1739–1749, 2004.

GALATI, E. A. B. Classificação de Phlebotominae. In: RANGEL, E. R.; LAINSON, R. Flebotomíneos do Brasil. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 2003. Cap. 2.1, p. 23-52.

GRIENSVEN, J. V.; DIRO, E. Visceral leishmaniasis. *Infect. Dis. Clin. North Am.*, v. 26, n. 2, p. 309-322, 2012.

GOHLKE, H.; HENDLICH, M; KLEBE, G. Knowledge-based scoring function to predict protein-ligand interactions. *J. Mol. Biol.*, v. 295, p. 337-356, 2000.

GROLL, M. *et al.* The catalytic sites of 20S proteasomes and their role in subunit maturation: a mutational and crystallographic study. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, v. 96, n. 20, p. 10976-83, 1999.

GOLD, W. *et al.* Amphotericins A and B, antifungal antibiotics produced by a streptomycete. I. In vitro studies. *Antibiot. Ann.*, v. 3, p. 579-86, 1956.

HARRIS, J. R. Release of a macromolecular protein component from human erythrocyte ghosts. *Biochim. Biophys. Acta.*, v. 150, n. 3, p. 534-537, 1968.

HEGERL, R. *et al.* The three-dimensional structure of proteasomes from *Thermoplasma acidophilum* as determined by electron microscopy using random conical tilting. *FEBS Lett.*, v. 283, n. 1, p. 117-21, 1991.

- HERSHKO, A. *et al.* (1983) Components of ubiquitin-protein ligase system. Resolution, affinity purification, and role in protein breakdown. *J. Biol. Chem.*, v. 258, p. 8206–8214, 1983.
- HILGARD, P. *et al.* Characterization of the antitumor activity of hexadecylphosphocholine (D 18506). *Eur. J. Canc. Clin. Oncol.*, v. 24, n. 9, p. 1457-1461, 1988.
- HILT, W.; WOLF, D. H Proteasomes: destruction as a programme. *Trends Biochem. Sci.*, v. 21, n. 3, p. 96-102, 1996.
- HOTEZ, P. J. *et al.* Incorporating a rapid-impact package for neglected tropical diseases with programs for HIV/AIDS, tuberculosis, and malaria. *PLoS Med.*, v. 3, n. 5, p. 0576-0584, 2006.
- HOUGH, R.; PRATT, G.; RECHSTEINER, M. Purification of two high molecular weight proteases from rabbit reticulocyte lysate. *J. Biol. Chem.*, v. 262, n. 17, p. 8303-13, 1987.
- HUANG, S. Y.; GRINTER, S. Z.; ZOU, X. Scoring functions and their evaluation methods for protein-ligand docking: recent advances and future directions. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, v. 12, n. 40, p. 12899-12908, 2010.
- JONES, G. *et al.* Development and validation of a genetic algorithm for flexible docking. *J. Chem. Inf. Model.*, v. 267, p. 727–748, 1997.
- KANE, M. M.; MOSSER, D. M. *Leishmania* parasites and their ploys to disrupt macrophage activation. *Curr. Opin. Hematol.*, v. 7, n. 1, p. 26-31, 2000.
- KAYE, P.; SCOTT, P. Leishmaniasis: complexity at the host–pathogen interface. *Nat. Rev. Microbiol.*, v. 9, n. 8, p. 604–615, 2011.
- KHARE, S. *et al.* Proteasome inhibition for treatment of leishmaniasis, Chagas disease and sleeping sickness. *Nature*, v. 537, n. 7619, p. 229-233, 2016.
- KIM, H. M.; YU, Y.; CHENG, Y. Structure characterization of the 26S proteasome. *BBA-Gene Regul. Mech.*, v. 1809, n. 2, p. 67-79, 2011.
- KORB, O; STÜTZLE, T.; EXNER, T. E. Empirical Scoring Functions for Advanced Protein–Ligand Docking with PLANTS. *J. Chem. Inf. Model.*, v. 49, p. 84–96, 2009.
- LAINSON, R; SHAW, J. Evolution, classification and geographical distribution. *In*. PETERS, W.; KILLICK-KENDRICK, R. eds. The leishmaniasis in biology and medicine. London: Academic Press Inc., 1987. chap. 1, p. 1-120.
- LI, J.; FU, A.; ZHANG, L. An Overview of Scoring Functions Used for Protein–Ligand Interactions in Molecular Docking. *Interdiscip. Sci. Comput. Life Sci.*, v. 11, p. 320–328, 2019.



- LODGE, R; DIALLO, T. O.; DESCOTEAUX, A. *Leishmania donovani* lipophosphoglycan blocks NADPH oxidase assembly at the phagosome membrane. *Cell. Microbiol.*, v. 8, n. 12, p. 1922-1931, 2006.
- MOHEBALI, M.; NADIM, A.; KHAMESIPOUR, A. An overview of leishmanization experience: A successful control measure and a tool to evaluate candidate vaccines. *Acta Trop.*, v. 200, n. 105173, p. 1-5, 2019.
- MONDAL, S.; BHATTACHARYA, P.; NAHID A. Current diagnosis and treatment of visceral leishmaniasis. *Expert Rev. Anti-Infect. Ther.*, v. 8, n. 8, p. 919, 2010.
- MORRIS, G. M. *et al.* Distributed automated docking of flexible ligands to proteins: Parallel applications of AutoDock 2.4. *J. Comput. Aided Mol. Des.* V. 10, p. 293–304, 1996
- MOOIJ, W. T. M.; VERDONK, M. L. General and targeted statistical potentials for protein–ligand interactions. *Science*, v. 61, p. 272-287, 2005.
- MORENO, J.; ALVAR, J. Canine leishmaniasis: epidemiological risk and the experimental model. *Trends Parasitol.*, v. 18, n. 9, p. 399-405, 1996.
- NAGLE, A. S. *et al.* Recent Developments in Drug Discovery for Leishmaniasis and Human African Trypanosomiasis. *Chem. Rev.*, v. 114, n. 22, p 11305–11347, 2014.
- NAGLE, A. S. *et al.* Discovery and Characterization of Clinical Candidate LXE408 as a Kinetoplastid-Selective Proteasome Inhibitor for the Treatment of Leishmaniasis. *J. Med. Chem.*, v. 63, n. 19, p 11305–11347, 2020.
- ODIWUOR, S. O. *et al.* Universal PCR assays for the differential detection of all Old World *Leishmania* species. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, v. 30, n. 2, p. 209-18, 2011.
- ORLOWSKI, M.; CARDOZO, C.; MICHAUD, C. Evidence for the presence of five distinct proteolytic components in the pituitary multicatalytic proteinase complex. Properties of two components cleaving bonds on the carboxyl side of branched chain and small neutral amino acids. *Biochemistry*, v. 32, n. 6, p. 1563–1572, 1993.
- PEREIRA, D. A.; WILLIAMS, J. A. Origin and evolution of high throughput screening. *Br. J. Pharmacol.*, v. 152, n. 1, p. 53–61, 2009.
- PEREIRA, P. M. L. *et al.* In vitro evaluation of antitrypanosomal activity and molecular docking of benzoylthioureas. *Parasitol. Int.*, v. 80, p. 102225, 2021.
- PETERS, N. C. *et al.* In Vivo Imaging Reveals an Essential Role for Neutrophils in Leishmaniasis Transmitted by Sand Flies. *Science*, v. 321, n. 5891, p. 970-974, 2008.
- PRATA, A. Treatment of kala-azar with amphotericin B. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, v. 57, n. 4, p. 266–268, 1963.

REMALEY, A. T. *et al.* Leishmanial phosphatase blocks neutrophil O-2 production. *J. Biol. Chem.*, v. 259, n. 18, p. 11173-5, 1984.

RIJAL, S. *et al.* Treatment of visceral leishmaniasis in south-eastern Nepal: decreasing efficacy of sodium stibogluconate and need for a policy to limit further decline. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, v. 97, n. 3, p. 350–354, 2003.

ROGERS, M. E.; CHANCE, M. L.; BATES, P. A. The role of promastigote secretory gel in the origin and transmission of the infective stage of *Leishmania mexicana* by the sandfly *Lutzomyia longipalpis*. *Parasitology*, v. 124, n. 5, p. 495-507, 2002.

SECCOMBE, A. K.; READY, P. D.; HUDDLESTON, L. M. A Catalogue of Old World Phlebotomine Sandflies (Diptera: Psychodidae, Phlebotominae). 8. ed. London: Intercept, 1993. 57 p.

SEEMÜLLER, E. *et al.* Proteasome from *Thermoplasma acidophilum*: A threonine protease. *Science*, v. 268, n. 5210, p. 579-582, 1995.

SHEN, Q. *et al.* Knowledge-Based Scoring Functions in Drug Design: 2. Can the Knowledge Base Be Enriched? *J. Chem. Inf. Model.*, v. 51, n. 2, p. 386–397, 2011.

STEVERDING, D. The history of leishmaniasis. *Parasite Vector*, v. 10, n. 82, p. 1-10, 2017.

SUDAR, S. *et al.* Failure of Pentavalent Antimony in Visceral Leishmaniasis in India: Report from the Center of the Indian Epidemic. *Clin. Infect. Dis.*, v. 31, n. 4, p. 1104–1107, 2000.

SUNYOTO, T.; POTET, J.; BOELAERT, M. Why miltefosine — a life-saving drug for leishmaniasis — is unavailable to people who need it the most. *BMJ Glob. Health.*, v. 3, n. 3, p. 1-10, 2018.

THIBAUDEAU, T. A.; SMITH, D. M. A practical review of proteasome pharmacology. *Pharmacol. Rev.*, v. 71, n. 2, p. 170-197, 2019.

THOMPSON, A. M. *et al.* Development of (6R)-2-Nitro-6-[4 (trifluoromethoxy)phenoxy]-6,7-dihydro-5H-imidazo[2,1-b][1,3]oxazine (DNDI-8219): A New Lead for Visceral Leishmaniasis. *J. Med. Chem.*, v. 61, n. 6, p. 2329–2352, 2018.

UNGER, C. *et al.* Hexadecylphosphocholine, a New Ether Lipid Analogue Studies on the Antineoplastic Activity in Vitro and in Vivo. *Acta Oncol.*, v. 28, n. 2, p. 213-217, 1989.

VINET, A. F. *et al.* The *Leishmania donovani* Lipophosphoglycan Excludes the Vesicular Proton-ATPase from Phagosomes by Impairing the Recruitment of Synaptotagmin V. *PLoS Pathog.*, v. 5, n. 10, p. 1-14, 2009.

WALKER, D. M. *et al.* Mechanisms of cellular invasion by intracellular parasites. *Cell. Mol. Life Sci.*, v. 71, n. 7, p. 1245-1263, 2013.

WANG, Z. *et al.* Comprehensive evaluation of ten docking programs on a diverse set of protein-ligand complexes: the prediction accuracy of sampling power and scoring power. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, v. 18, p. 12964-75, 2016.

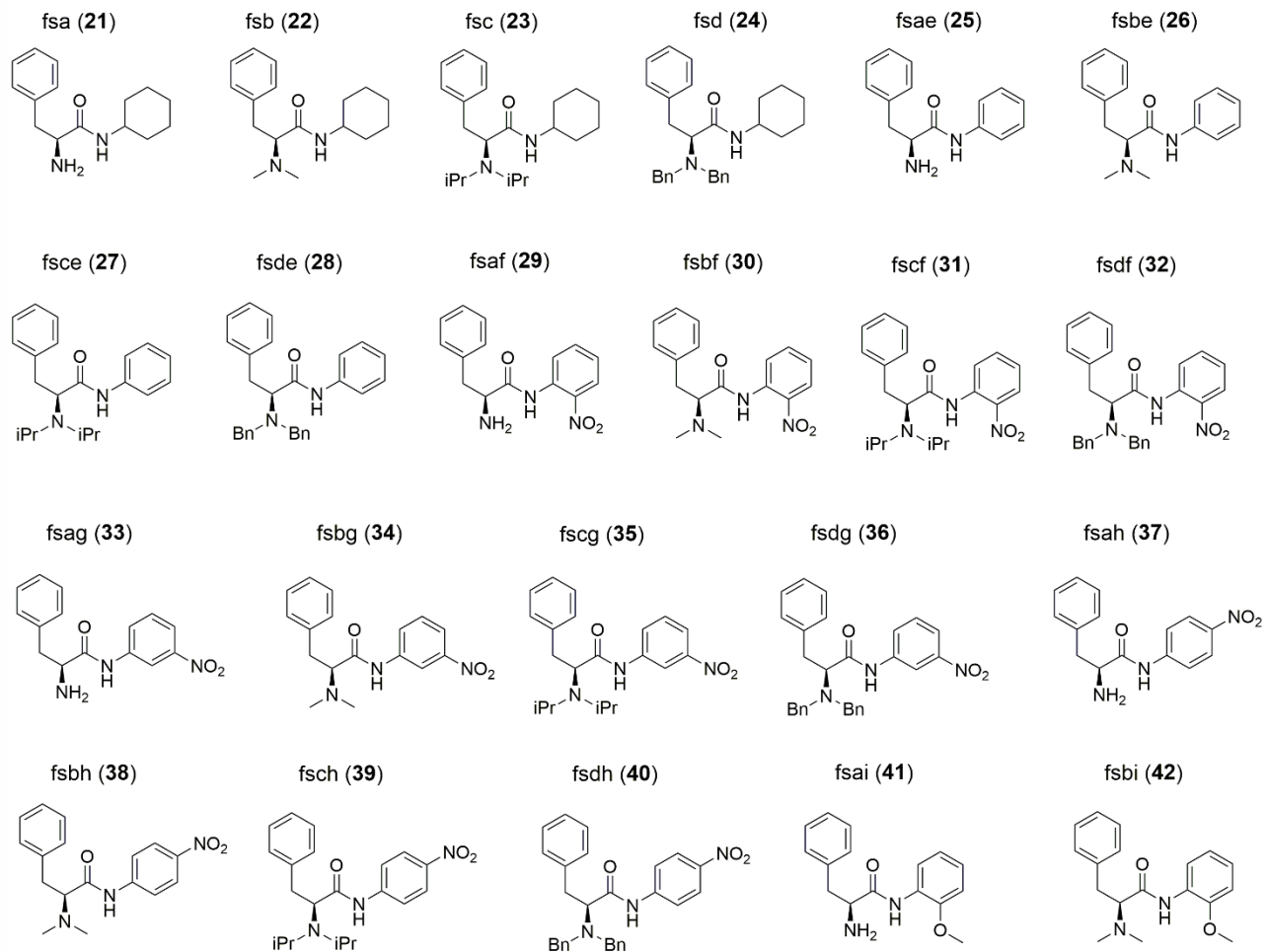
WHO. Leishmaniasis. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>. Acesso em: 04 out. 2020.

WIWANITKIT, V. Interest in paromomycin for the treatment of visceral leishmaniasis (kala-azar). *Ther. Clin. Risk Manag.*, v. 71, n., p. 323–328, 2012.

WYLLIE, S. *et al.* Preclinical candidate for the treatment of visceral leishmaniasis that acts through proteasome inhibition. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, v. 116, n. 19, p. 9318-9323, 2019.

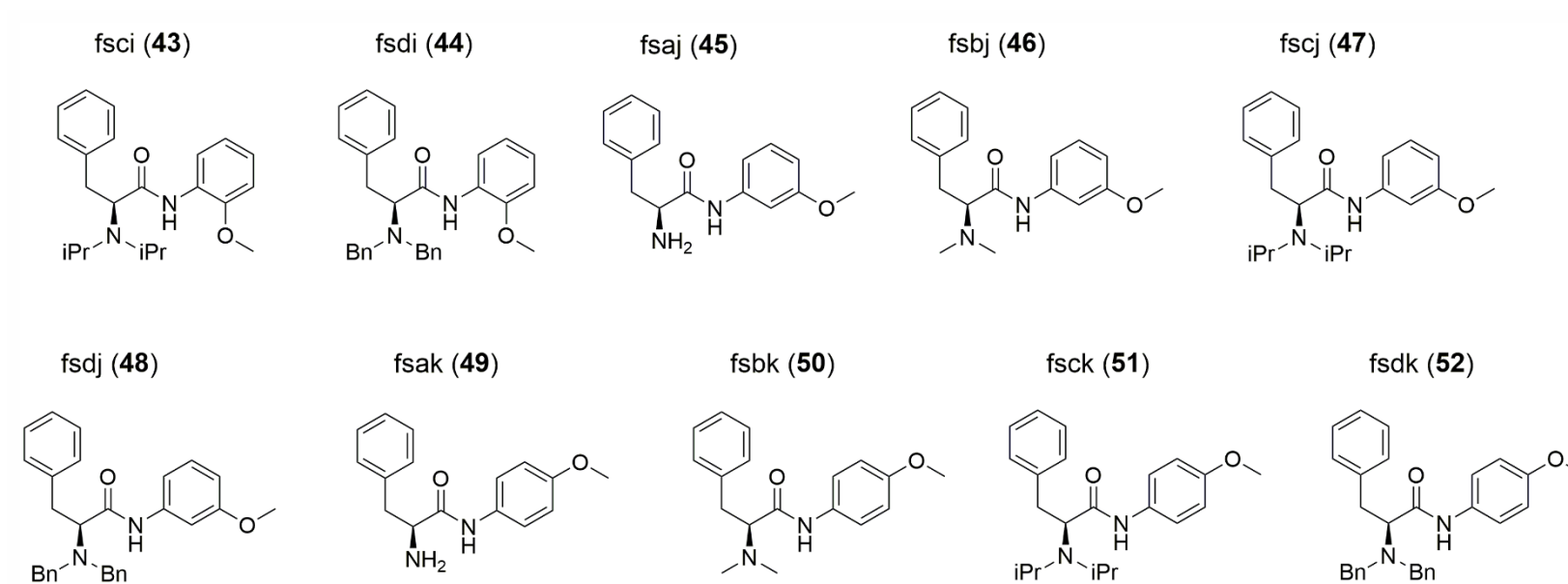
ZORZETTO, R. Uma doença anunciada. *Revista Pesquisa FAPESP*. ed. 151, set. 2008. Disponível em: <https://revistapesquisa.fapesp.br/2008/09/01/uma-doenca-anunciada/>. Acesso em: 11 out. 2019

**APÊNDICE A** — Fórmula estrutural de cada um dos 243 compostos triados no modelo computacional da proteassoma 20S da espécie *Leishmania tarentolae*.

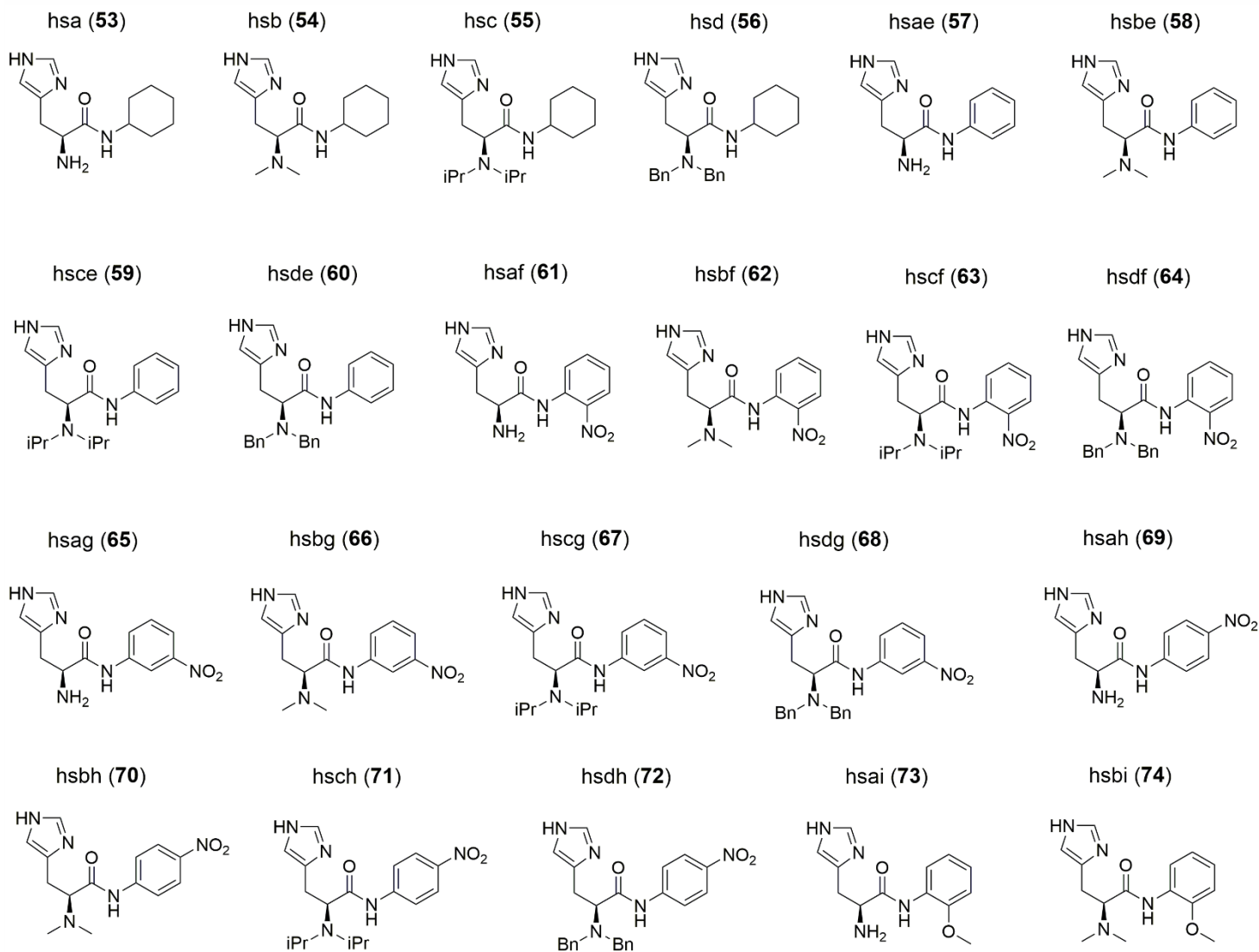


**Figura A1** — Fórmulas estruturais dos ligantes derivados aminoacídicos. Imagem gerada no programa ChemDraw Pro, versão 12.0.2.1076

**Fonte:** elaborado pelo autor.

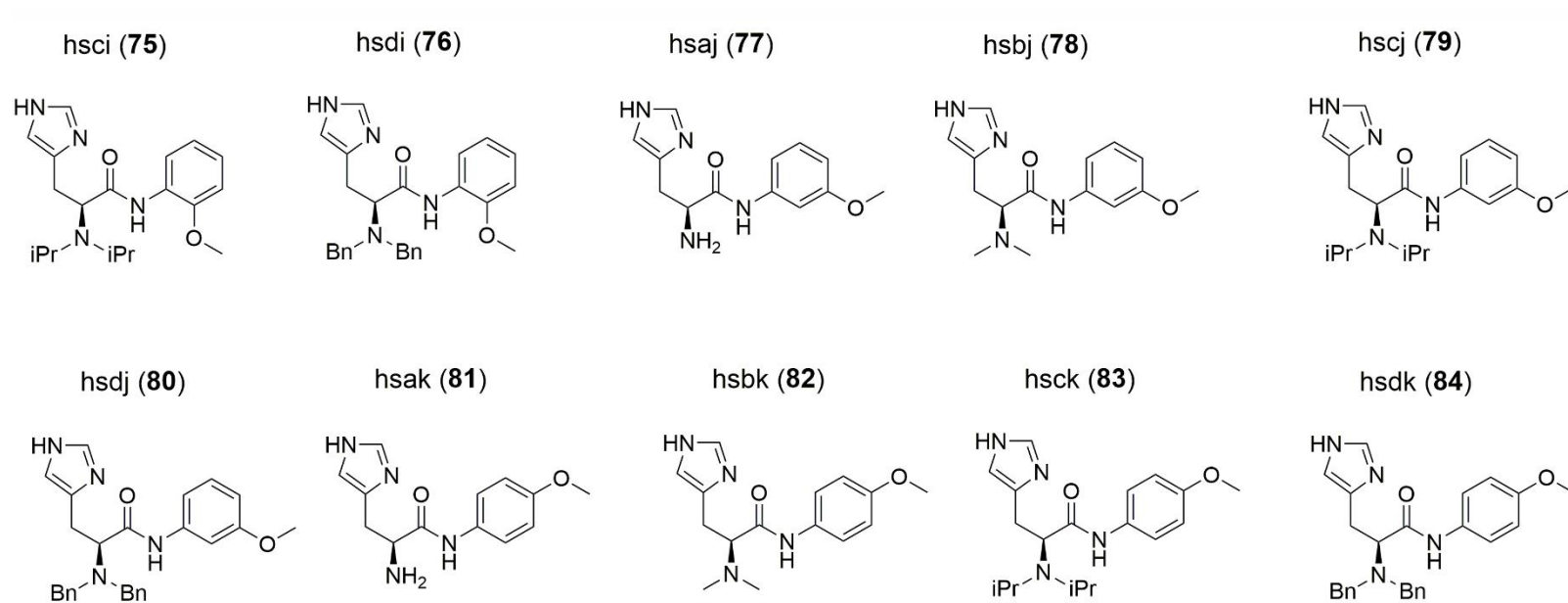


**Figura A2** — Fórmulas estruturais dos ligantes derivados aminoacídicos. Imagem gerada no programa ChemDraw Pro, versão 12.0.2.1076  
**Fonte:** elaborado pelo autor.

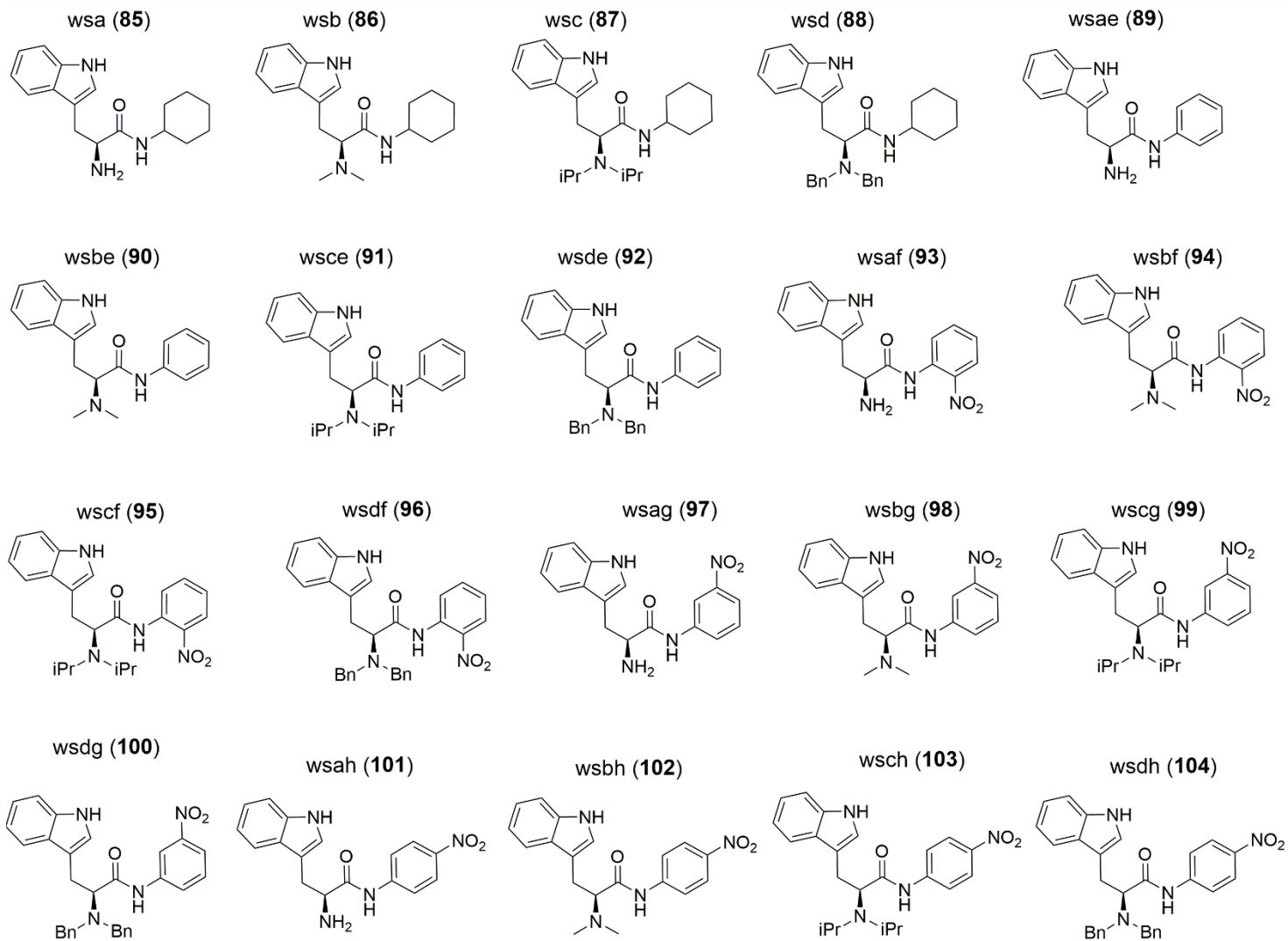


**Figura A3** — Fórmulas estruturais dos ligantes derivados aminoacídicos. Imagem gerada no programa ChemDraw Pro, versão 12.0.2.1076

**Fonte:** elaborado pelo autor.



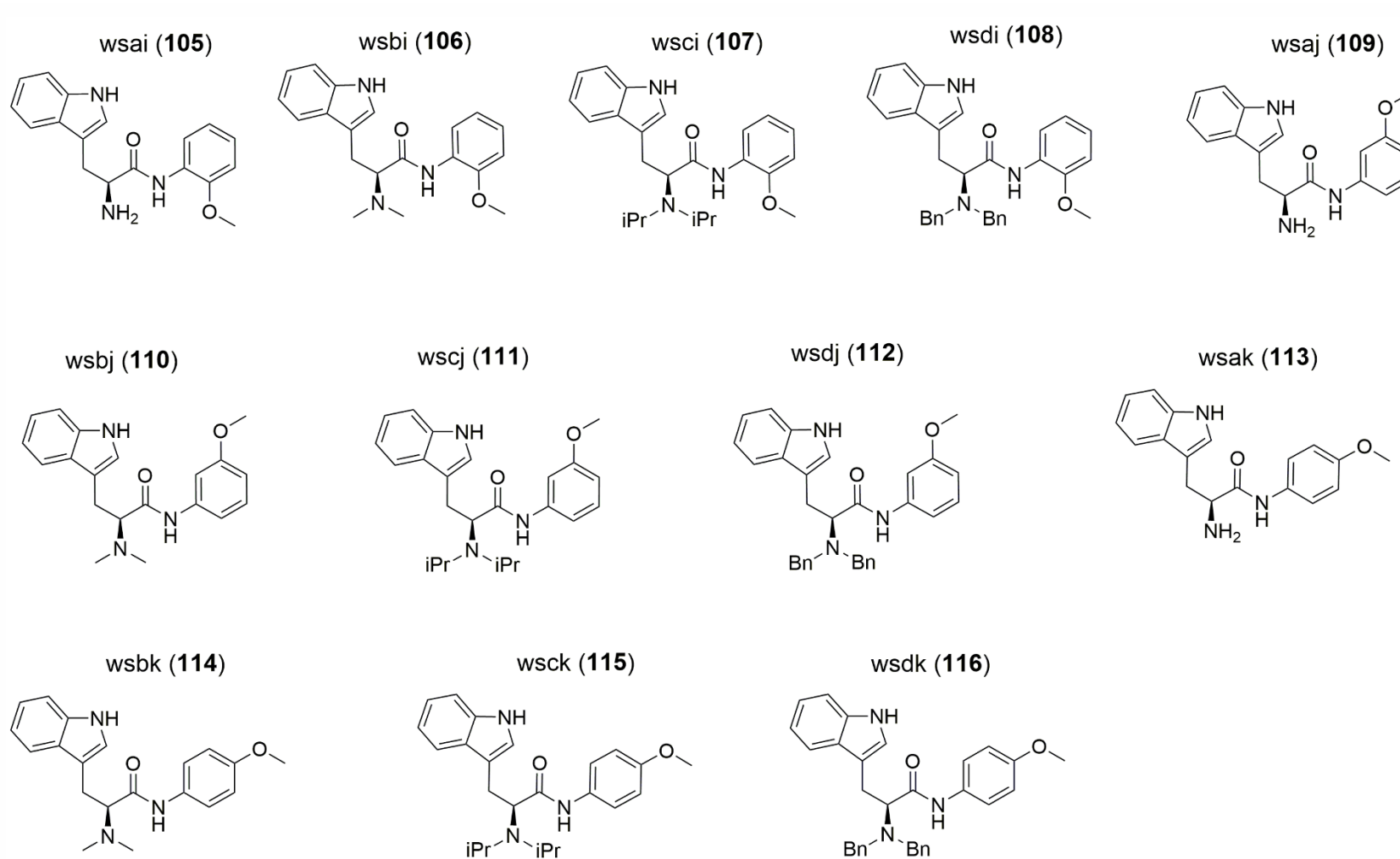
**Figura A4** — Fórmulas estruturais dos ligantes derivados aminoácidos. Imagem gerada no programa ChemDraw Pro, versão 12.0.2.1076  
**Fonte:** elaborado pelo autor.



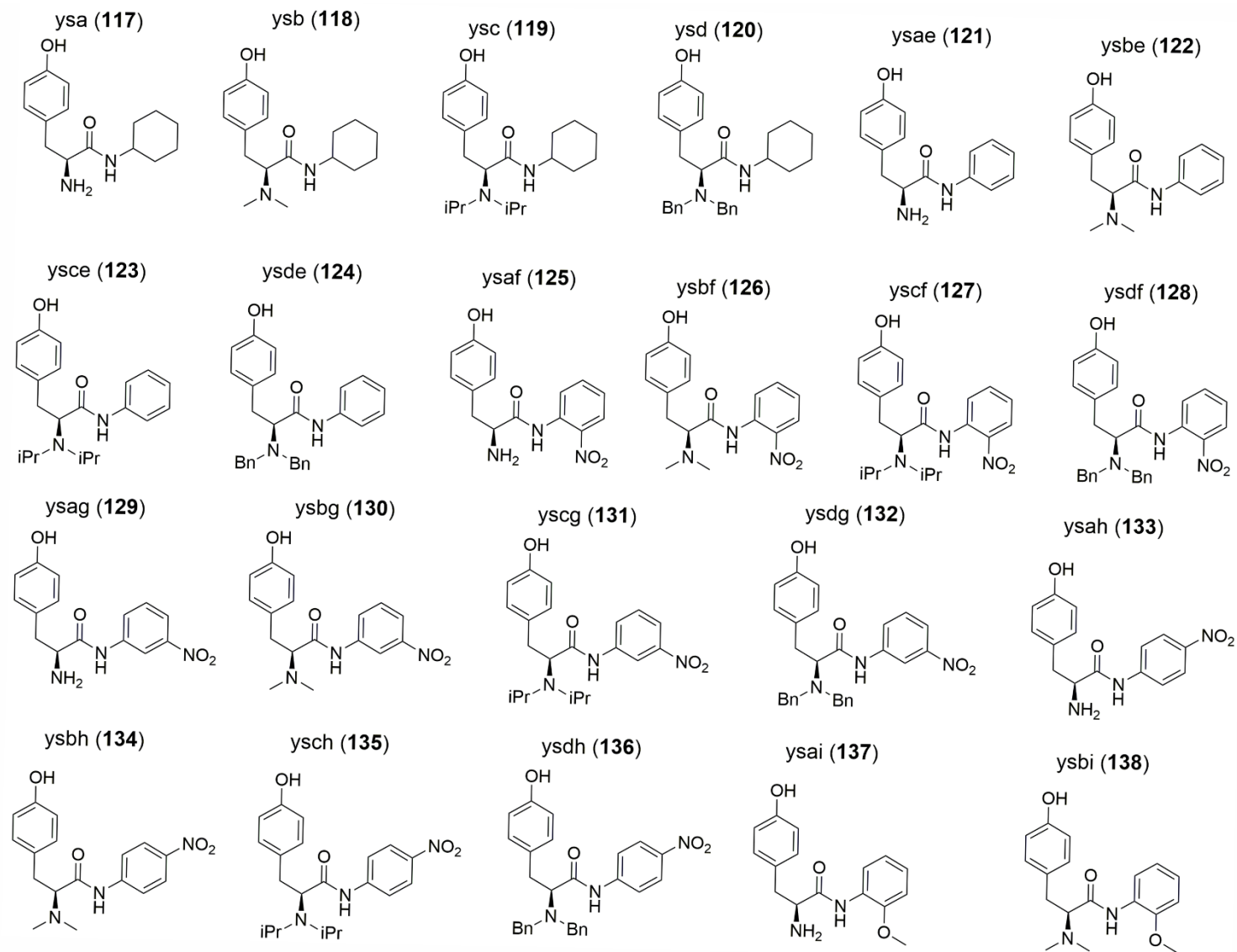
**Figura A5** — Fórmulas estruturais dos ligantes derivados aminoacídicos. Imagem gerada no programa ChemDraw Pro, versão 12.0.2.1076

**Fonte:** elaborado pelo autor.



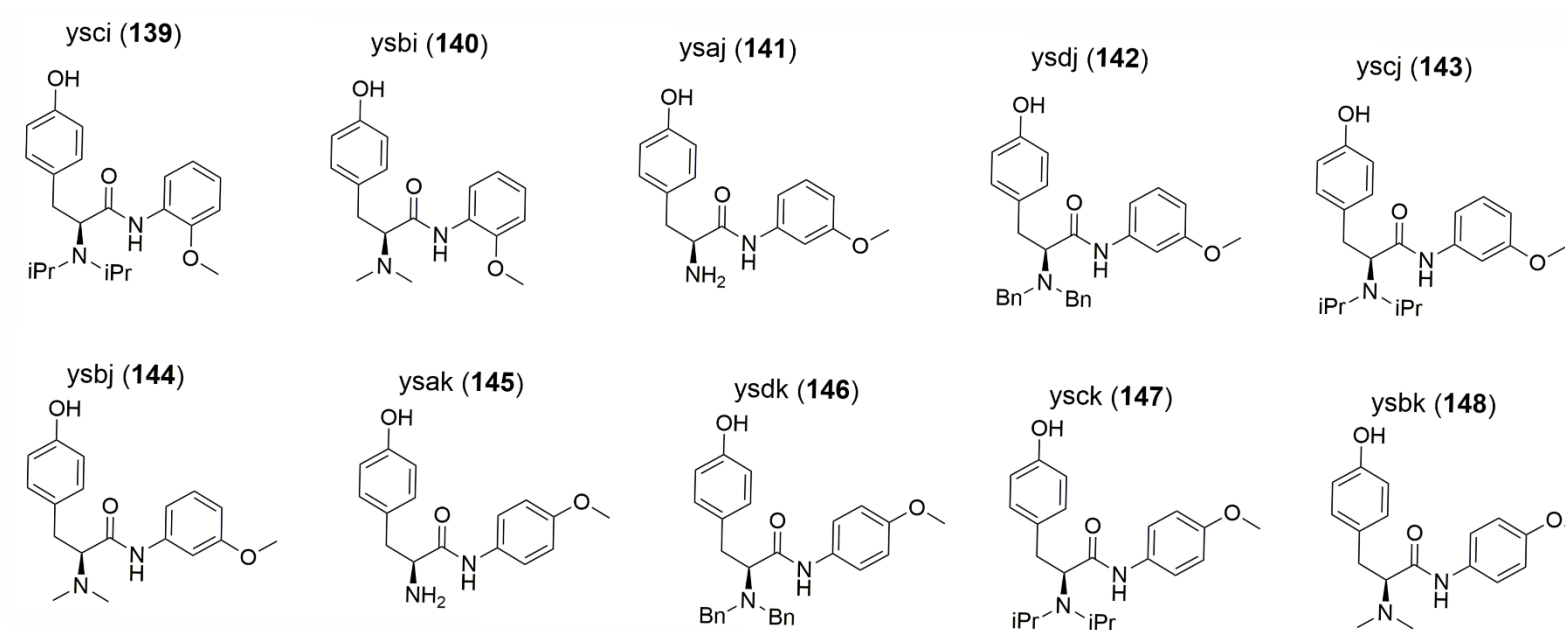


**Figura A6** — Fórmulas estruturais dos ligantes derivados aminoacídicos. Imagem gerada no programa ChemDraw Pro, versão 12.0.2.1076  
**Fonte:** elaborado pelo autor.



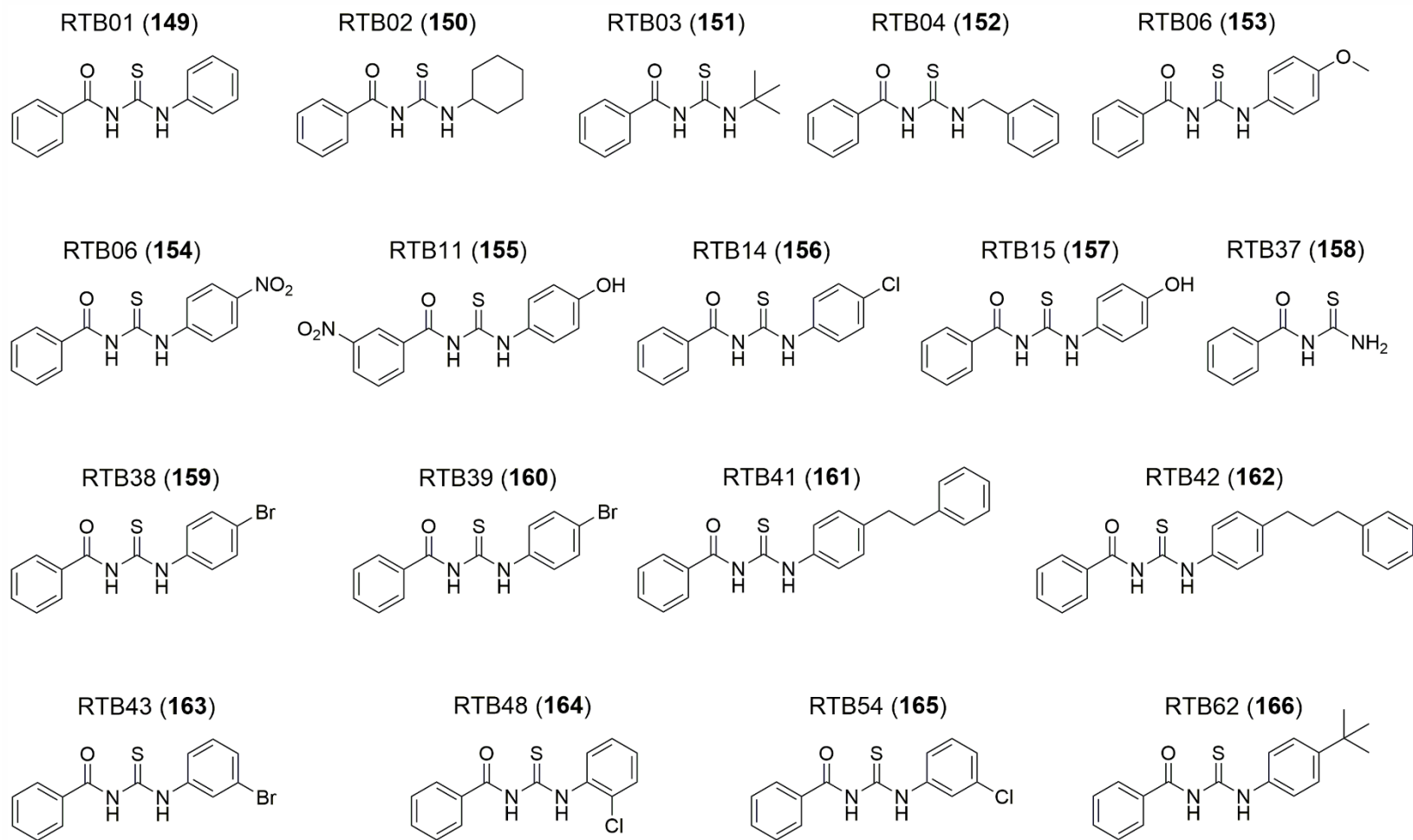
**Figura A7** — Fórmulas estruturais dos ligantes derivados aminoacídicos. Imagem gerada no programa ChemDraw Pro, versão 12.0.2.1076

**Fonte:** elaborado pelo autor.



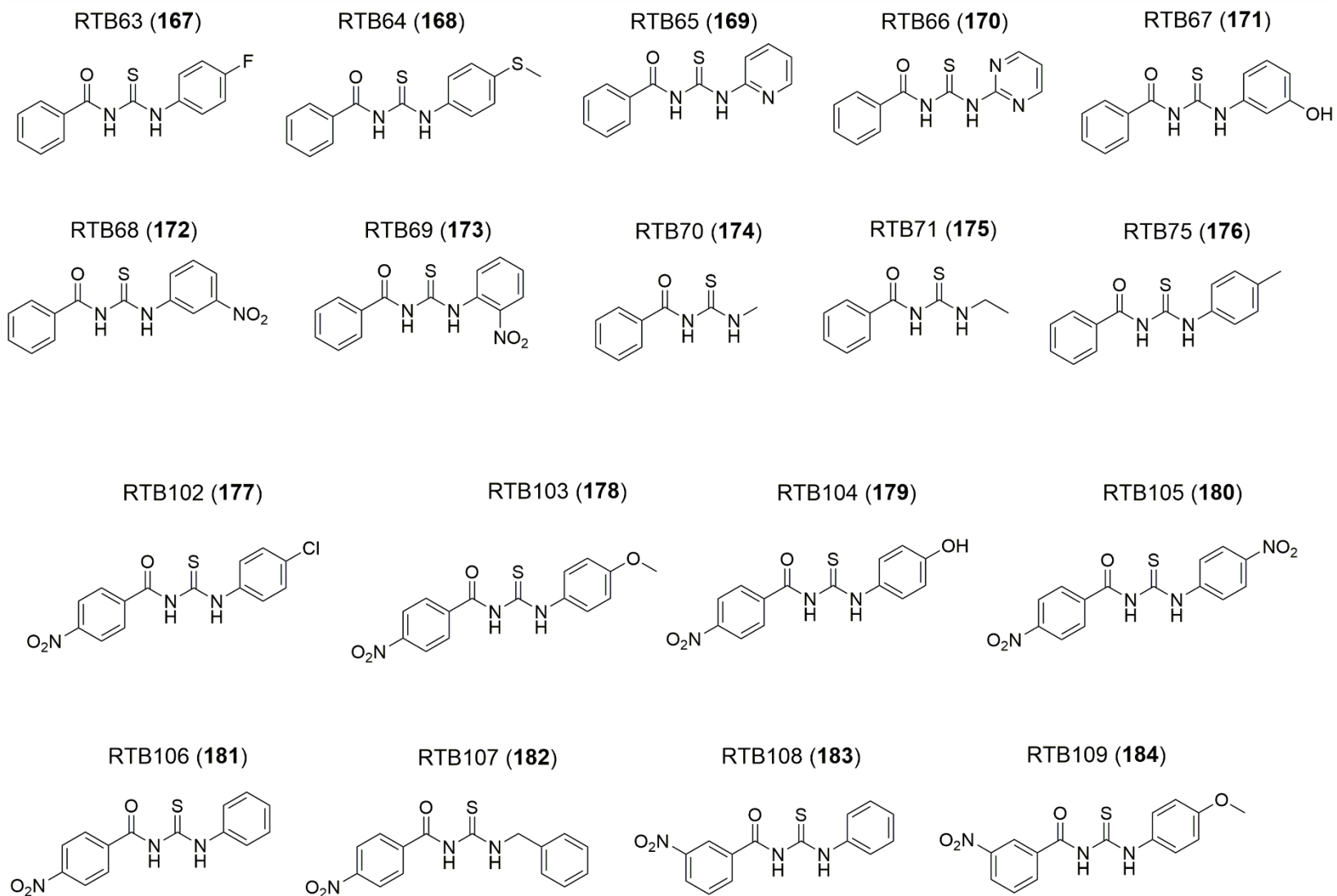
**Figura A8** — Fórmulas estruturais dos ligantes derivados aminoacídicos. Imagem gerada no programa ChemDraw Pro, versão 12.0.2.1076

**Fonte:** elaborado pelo autor.

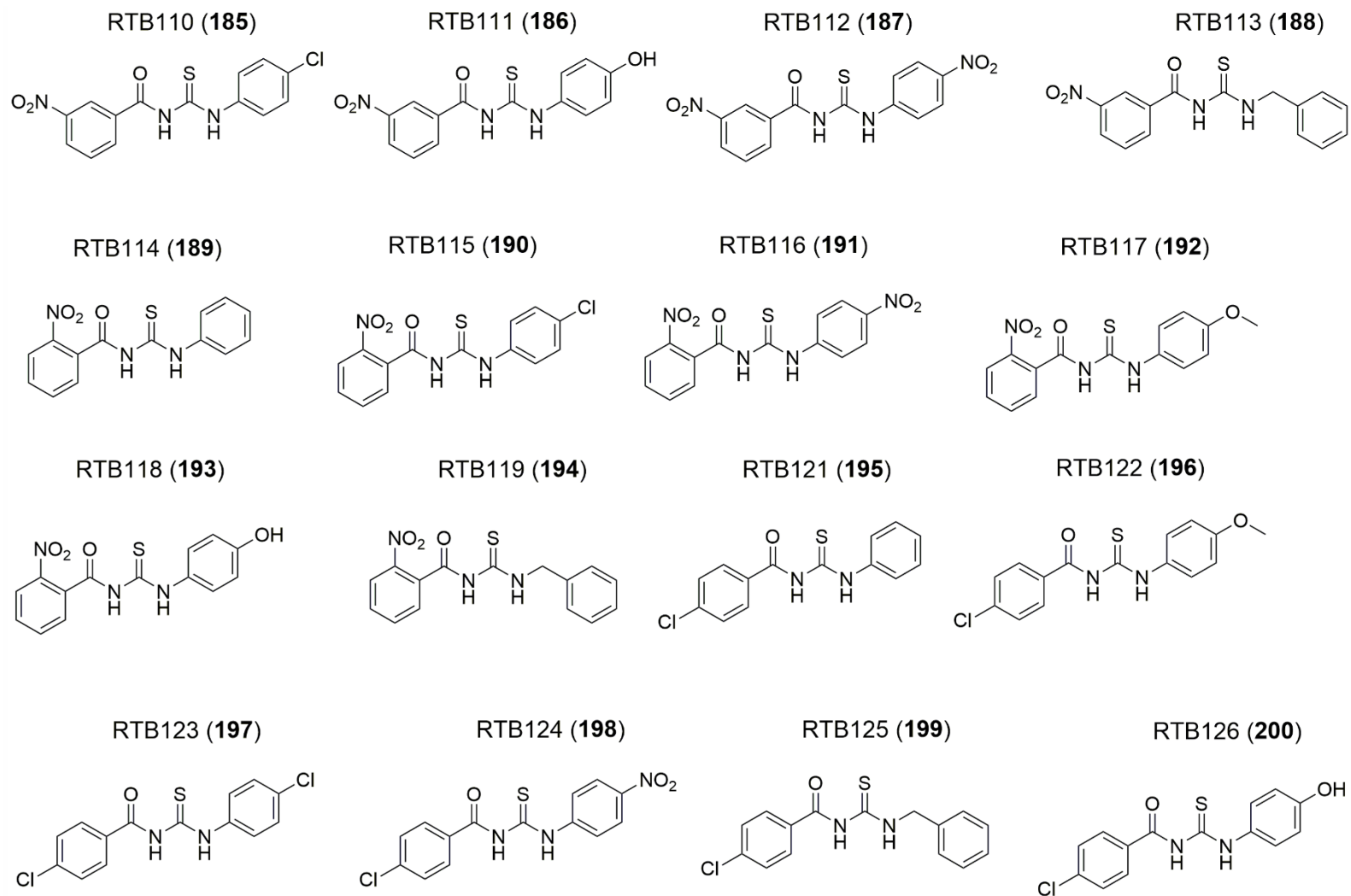


**Figura A9** — Fórmulas estruturais dos ligantes de padrão estrutural benzoiltiouréia. Imagem gerada no programa ChemDraw Pro, versão 12.0.2.1076

**Fonte:** elaborado pelo autor.

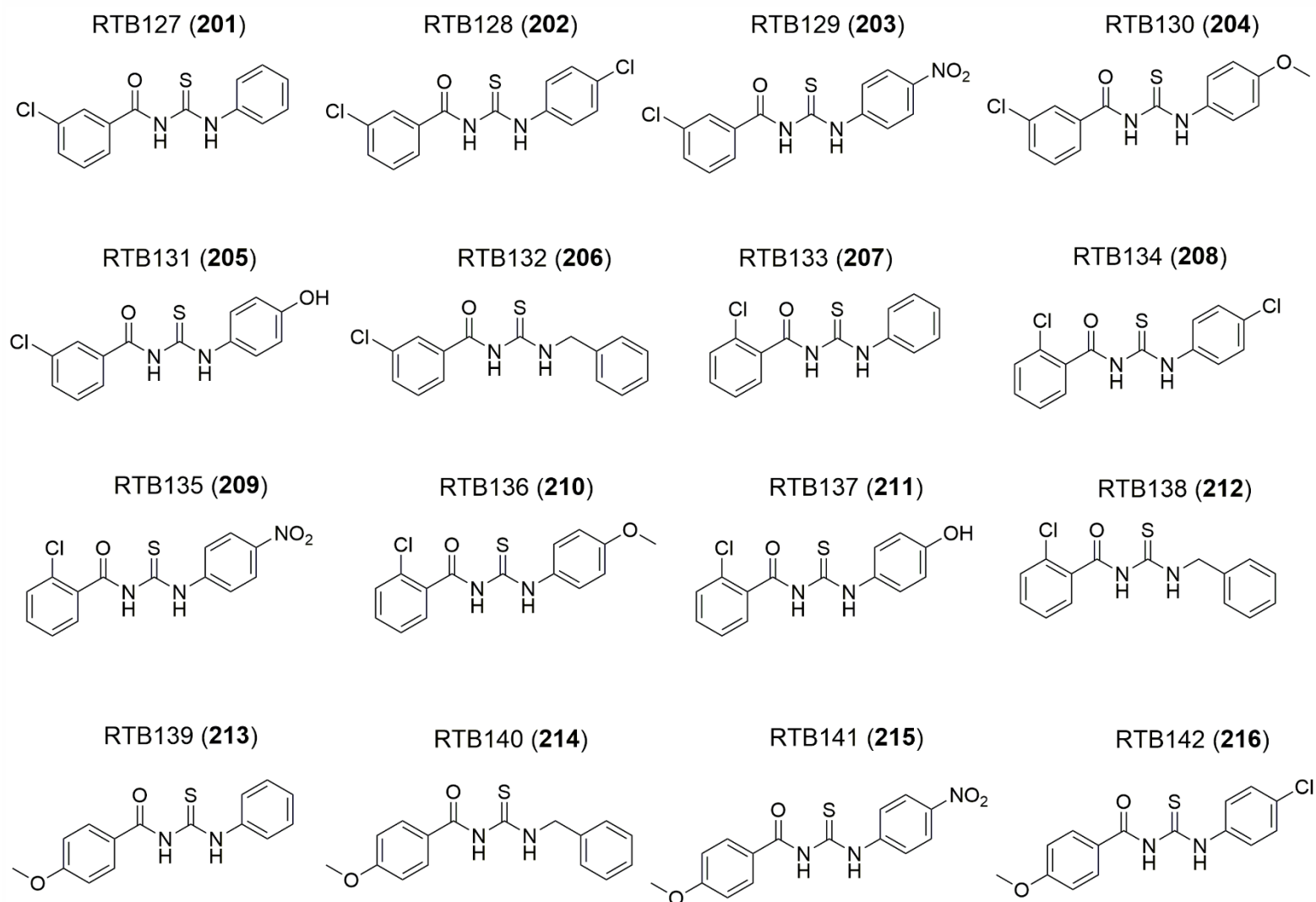


**Figura A10** — Fórmulas estruturais dos ligantes de padrão estrutural benzoiltiuréia. Imagem gerada no programa ChemDraw Pro, versão 12.0.2.1076  
**Fonte:** elaborado pelo autor.

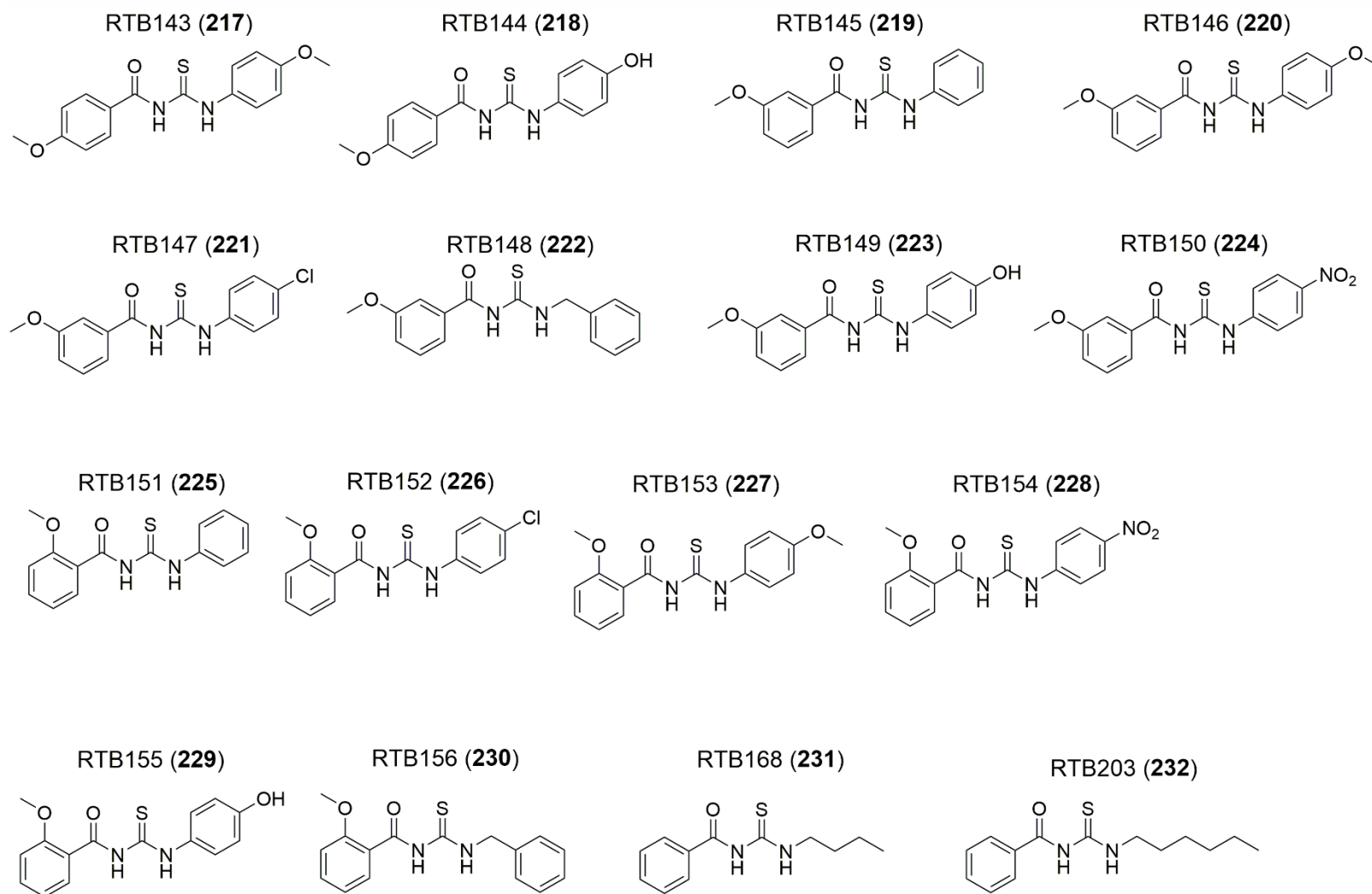


**Figura A11** — Fórmulas estruturais dos ligantes de padrão estrutural benzoiltiouréia. Imagem gerada no programa ChemDraw Pro, versão 12.0.2.1076

**Fonte:** elaborado pelo autor.

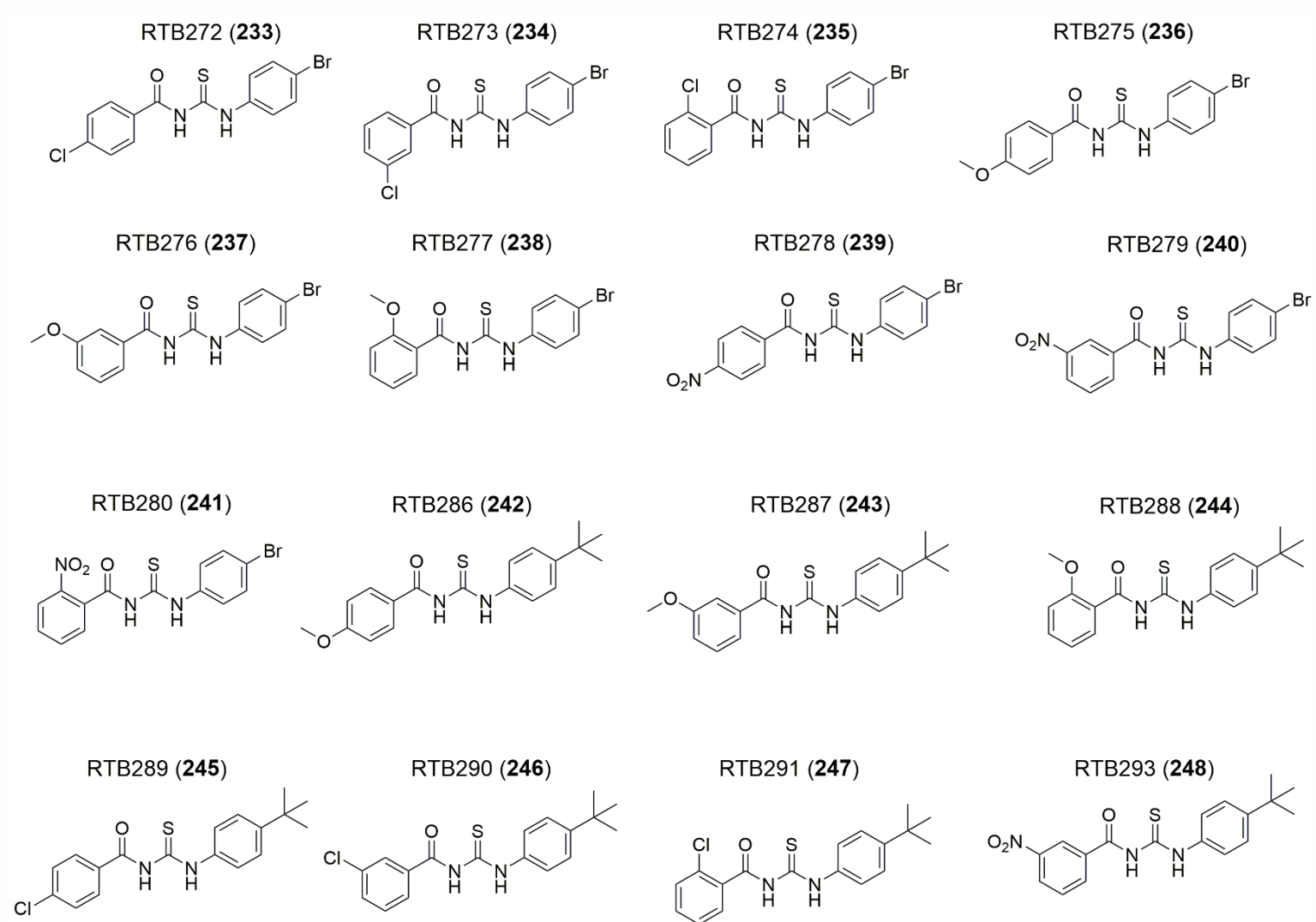


**Figura A12** — Fórmulas estruturais dos ligantes de padrão estrutural benzotioúrea. Imagem gerada no programa ChemDraw Pro, versão 12.0.2.1076  
**Fonte:** elaborado pelo autor.

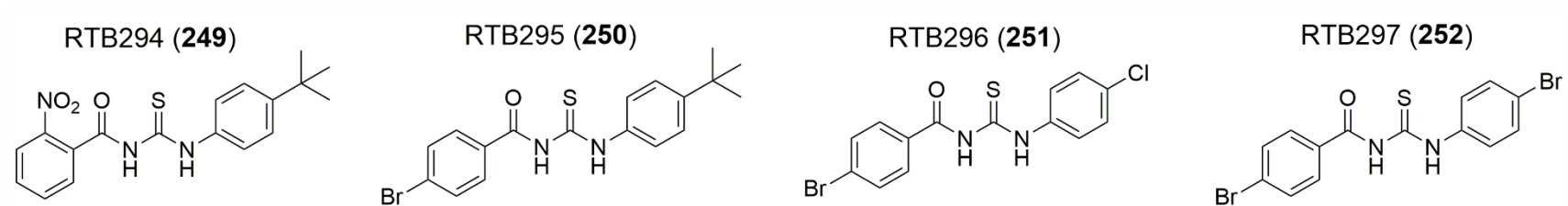


**Figura A13** — Fórmulas estruturais dos ligantes de padrão estrutural benzotiouréia. Imagem gerada no programa ChemDraw Pro, versão 12.0.2.1076  
**Fonte:** elaborado pelo autor.





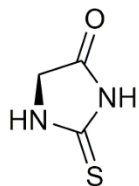
**Figura A14** — Fórmulas estruturais dos ligantes de padrão estrutural benzotiouréia. Imagem gerada no programa ChemDraw Pro, versão 12.0.2.1076  
**Fonte:** elaborado pelo autor.



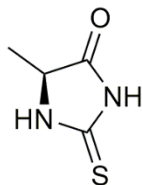
**Figura A15** — Fórmulas estruturais dos ligantes de padrão estrutural benzoiltiuréia. Imagem gerada no programa ChemDraw Pro, versão 12.0.2.1076

**Fonte:** elaborado pelo autor.

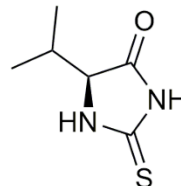
PGC26D(S) (253)



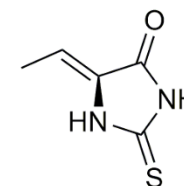
PGC29D(S) (254)



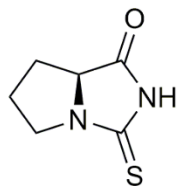
PGC12(S) (255)



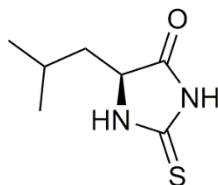
PGC24(S) (256)



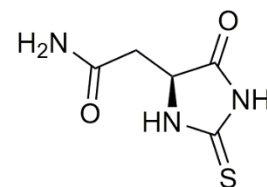
PGC11(S) (257)



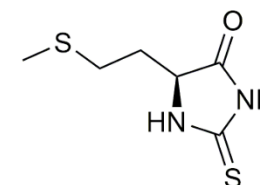
PGC03(S) (258)



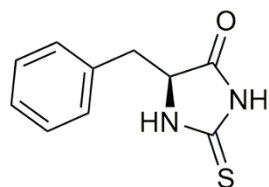
PGC35D(S) (259)



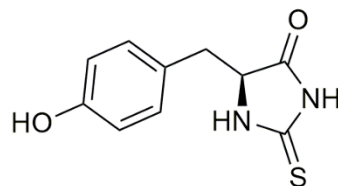
PGC13(S) (260)



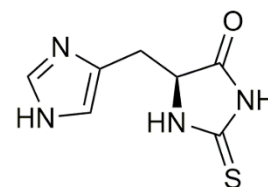
PGC07(S) (261)



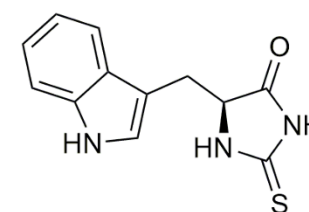
PGC31(S) (262)



PGC37(S) (263)



PGC05(S) (264)



**Figura A16** — Fórmulas estruturais dos ligantes de padrão estrutural tio-hidantoína. Imagem gerada no programa ChemDraw Pro, versão 12.0.2.1076

**Fonte:** elaborado pelo autor.

## APÊNDICE B — Quadro de interações para todos os ligantes triados

	F24	G228	S195	S229	T100	V227	Y212
LJ6E4000							
LN2E401							
wsbf							
wsde							
hsbh							
hsbj							
wsag							
wsbg							
wsbh							
wscg							
wscj							
wsbj							
wsdi							
hscg							
fsag							
fsdh							
hsag							
wsdf							
ysch							
ysdf							
hscf							
hsci							
hsdh							
yscf							
fsdk							
ysbi							

Legenda interações

- $\pi$ - $\sigma$ ,  $\pi$ -alquila, empilhamento- $\pi$ , empilhamento-T ou hidrofóbica
- Ligação de hidrogênio
- Interação de halogênio

**Quadro B1** — Interações entre derivados aminoácídicos e os resíduos de aminoácidos chave  
**Fonte:** elaborado pelo autor.

	F24			G228			S195			S229			T100			V227			Y212		
ysag	■			■	■	■				■					■				■		
fscg	■	■								■			■	■			■	■			
fsch	■									■			■	■			■				
fscj	■	■	■							■	■		■	■			■				
hsbg				■						■			■	■							■
hsc	■	■								■			■			■	■				
hsce	■	■								■			■	■			■	■			
hsch	■									■			■	■			■	■			
hscj	■	■								■			■			■					
hsdg				■	■			■		■	■		■								
wsaf	■	■		■									■			■	■				
wsc	■									■			■			■	■				
wscf	■			■						■			■								
wsch	■	■	■	■									■	■		■					
wsdh	■	■		■	■	■							■	■		■	■				
wsdk	■	■		■	■								■	■		■	■				
yscg	■	■		■									■			■	■				
yscj	■	■								■			■	■		■					
ysdg	■									■			■	■							■
ysdi	■	■								■			■	■		■					
fsa	■			■												■			■	■	
fsb	■							■	■							■			■		
fsbi	■	■						■	■							■			■		
fsbk				■				■	■							■			■		
fsdf	■			■				■	■		■										
hsa	■			■	■											■			■	■	
hsah	■			■				■	■							■					
hsai	■	■		■	■	■				■	■					■					
wsa	■			■												■			■	■	
wsae	■			■												■			■	■	
wsbk	■							■	■							■			■		
wsci	■	■	■	■												■	■		■		
wsd	■			■				■		■											

Legenda interações



- $\pi$ - $\sigma$ ,  $\pi$ -alquila, empilhamento- $\pi$ , empilhamento-T ou hidrofóbica
- Ligação de hidrogênio

**Quadro B2** — Interações entre derivados aminoácídicos e os resíduos de aminoácidos chave

**Fonte:** elaborado pelo autor.

	F24	G228	S195	S229	T100	V227	Y212
ysae							
ysai							
ysb							
ysbe							
ysbj							
ysci							
wsai							
fsdj							
hsdf							
hsdi							
hsdj							
hsdk							
wsck							
wsdg							
hsak							
ysbf							
fsae							
fsaf							
fsah							
fsai							
fsak							
fsbe							
fsbh							
fsce							
fscf							
fsck							
fsdi							
hsae							
hsaf							
hsaj							
hsde							
wsah							
wsak							

Legenda interações

-   $\pi$ - $\sigma$ ,  $\pi$ -alquila, empilhamento- $\pi$ , empilhamento-T ou hidrofóbica  
 Ligação de hidrogênio

**Quadro B3** — Interações entre derivados aminoácídicos e os resíduos de aminoácidos chave

**Fonte:** elaborado pelo autor.

	F24		G228			S195		S229		T100			V227		Y212		
wsb	■	■	■										■				
wsbe	■														■	■	
ysaf	■		■	■	■								■				
ysah	■					■							■				
ysaj	■												■	■	■	■	
ysak	■												■		■		
ysbh	■		■										■				
ysbk	■		■										■				
fsbg								■		■	■	■					
fsci								■	■	■							
fsdg								■		■	■						
ysbg								■		■	■	■					
ysd								■	■	■							
ysde								■	■	■	■						
ysdh								■		■	■	■					
ysdj								■		■	■						
fsaj													■		■	■	
fsc	■												■	■			
fsd	■							■									
hsb	■												■				
hsd	■						■	■									
wsce	■	■											■				
ysce	■														■	■	
ysdk	■							■									
hsbf										■							
ysc															■	■	
ysck															■	■	
fsbf																	
fsbj																	

Legenda interações

■  $\pi$ - $\sigma$ ,  $\pi$ -alquila, empilhamento- $\pi$ , empilhamento-T ou hidrofóbica  
 ■ Ligação de hidrogênio

**Quadro B4** — Interações entre derivados aminoácídicos e os resíduos de aminoácidos chave **Fonte:** elaborado pelo autor.

	F24	G228	S195	S229	T100	V227	Y212
RTB113							
RTB117							
RTB148							
RTB294							
RTB68							
RTB107							
RTB108							
RTB109							
RTB110							
RTB111							
RTB276							
RTB279							
RTB03							
RTB04							
RTB37							
RTB41							
RTB42							
RTB67							
RTB70							
RTB71							
RTB106							
RTB112							
RTB114							
RTB134							
RTB135							
RTB136							
RTB139							
RTB140							
RTB141							
RTB142							
RTB147							
RTB150							
RTB154							

Legenda interações

- $\pi$ - $\sigma$ ,  $\pi$ -alquila, empilhamento- $\pi$ , empilhamento-T ou hidrofóbica
- $\pi$ -Enxofre
- Ligação de hidrogênio
- Interação de halogênio

**Quadro B5** — Interações entre benzoiltiouréias e os resíduos de aminoácidos chave

**Fonte:** elaborado pelo autor.



	F24		G228	S195	S229	T100			V227	Y212	
RTB168	■		■						■		■
RTB203	■		■						■		■
RTB280	■			■					■		■
RTB288	■		■		■	■	■				
RTB291	■		■	■					■		■
RTB293	■		■		■	■	■	■			
RTB01	■	■							■		■
RTB02			■						■		■
RTB06	■	■							■		■
RTB07	■	■							■		■
RTB14	■	■							■		■
RTB38	■	■							■		■
RTB39			■	■					■		■
RTB43			■	■					■		■
RTB48			■	■					■		■
RTB62	■	■							■		■
RTB63	■								■		■
RTB64	■								■		■
RTB65	■								■		■
RTB66	■								■		■
RTB69	■	■							■		■
RTB75			■						■		■
RTB102	■				■				■		
RTB103	■		■						■		
RTB104	■		■						■		
RTB105	■		■						■		
RTB115	■		■						■		
RTB118	■		■						■		
RTB119	■								■		■
RTB121	■								■		■
RTB122	■								■		■
RTB123	■								■		■
RTB124	■								■		■

Legenda interações




- $\pi$ - $\sigma$ ,  $\pi$ -alquila, empilhamento- $\pi$ , empilhamento-T ou hidrofóbica
- Ligação de hidrogênio

**Quadro B6** — Interações entre benzoiltiouréias e os resíduos de aminoácidos chave

**Fonte:** elaborado pelo autor.

	F24		G228		S195	S229		T100		V227		Y212	
RTB125													
RTB126													
RTB127													
RTB130													
RTB132													
RTB133													
RTB137													
RTB138													
RTB143													
RTB144													
RTB145													
RTB149													
RTB151													
RTB153													
RTB155													
RTB156													
RTB272													
RTB274													
RTB275													
RTB278													
RTB286													
RTB289													
RTB292													
RTB295													
RTB296													
RTB297													
RTB11													
RTB15													
RTB54													
RTB116													
RTB128													
RTB129													
RTB131													



Legenda interações

-   $\pi$ - $\sigma$ ,  $\pi$ -alquila, empilhamento- $\pi$ , empilhamento-T ou hidrofóbica  
  $\pi$ -Enxofre  
 Ligação de hidrogênio

**Quadro B7** — Interações entre benzoiltiouréias e os resíduos de aminoácidos chave  
**Fonte:** elaborado pelo autor.

	F24			G228			S195			S229			T100			V227			Y212					
RTB146																								
RTB152																								
RTB273																								
RTB277																								
RTB287																								
RTB290																								

Legenda interações

-   $\pi$ - $\sigma$ ,  $\pi$ -alquila, empilhamento- $\pi$ , empilhamento-T ou hidrofóbica
-  Ligação de hidrogênio

**Quadro B8** — Interações entre benzoiltiouréias e os resíduos de aminoácidos chave  
**Fonte:** elaborado pelo autor.

	F24	G228	S195	T100	V227	Y212
PGC24						
PGC03						
PGC31						
PGC37						
PGC11						
PGC13						
PGC07						
PGC05						
PGC26D						
PGC29D						
PGC12						
PGC35D						

Legenda interações

- $\pi$ - $\sigma$ ,  $\pi$ -alquila, empilhamento- $\pi$ , empilhamento-T ou hidrofóbica
- $\pi$ -Enxofre
- Ligação de hidrogênio

**Quadro B9** — Interações entre tio-hidantoínas e os resíduos de aminoácidos chave

**Fonte:** elaborado pelo autor.

**CONSTRUÇÃO, OTIMIZAÇÃO E ANCORAGEM MOLECULAR DE SUBSTÂNCIAS BIOATIVAS EM BIOMACROMOLÉCULAS: UM TUTORIAL PRÁTICO**Victor S. Batista<sup>a, b</sup>, Renan L. Farias<sup>b</sup>, Leonardo P. M. Simões<sup>a</sup> e Nailton M. Nascimento-Júnior<sup>a, \*</sup><sup>a</sup>Departamento de Bioquímica e Química Orgânica, Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, 14800-060 Araraquara – SP, Brasil<sup>b</sup>Departamento de Química Analítica, Físico-Química e Inorgânica, Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, 14800-060 Araraquara – SP, Brasil

Recebido em 27/05/2021; aceito em 23/08/2021; publicado na web em 15/09/2021

CONSTRUCTION, OPTIMIZATION AND MOLECULAR DOCKING OF BIOACTIVE SUBSTANCES IN BIOMACROMOLECULES: A PRACTICAL TUTORIAL. In the last two decades, increasing advances in molecular biology and instrumental analysis for solving macromolecular structures have amplified the applicability of cheminformatics in drug discovery. In particular, molecular docking, an *in silico* structural-based method, has prospered as an efficient tool for understanding molecular interactions that drives formation of stable receptor-ligand systems. Brazil affords many research groups working hard on this subject; however, there is a lack of material in the Portuguese language, teaching how to apply molecular docking methodologies. Herein, we define and discuss a simple and low-cost workflow for molecular docking evaluation, comprising software installation (supplemental material) and how to use them for construction of small-molecules, perform docking calculations, analysis of the results and the preparation of quality figures. Given that, we have used free software and web-servers, as well as *in silico* tools supported by national funding agencies.

Keywords: molecular docking tutorial; Biovia DSV; MOPAC2016; CCDC GOLD suit; PyMol.

**INTRODUÇÃO**

A interface entre os protocolos de expressão e purificação de proteínas, proteômica e técnicas de resolução estrutural (difração de raios X, ressonância magnética nuclear, microscopia eletrônica criogênica, espalhamento de raios X de baixo ângulo e laser de raios X de elétrons livres), tem contribuído significativamente com a identificação e resolução estrutural de alvos terapêuticos biomoleculares.<sup>1-3</sup> Muitos desses alvos contemplam os depósitos de suas coordenadas cartesianas atômicas em bancos de dados com acesso público (ex. *Protein Data Bank*).<sup>4</sup>

Como consequência, o uso de rotinas *in silico* nos estágios iniciais da descoberta de fármacos, estruturalmente específicos, tem recebido máxima relevância. Visualizar micromoléculas ligantes interagindo com seus alvos biológicos é parte fundamental da estratégia SBDD (*structure-based drug design*).<sup>5-8</sup> Esses complexos fornecem detalhes acerca das variáveis que governam o processo de reconhecimento molecular nos sítios de ligação da biomacromolécula receptora. Além disso, quando predições computacionais complementam dados experimentais, obtêm-se caminhos mais sustentáveis no processo de descoberta de fármacos, tendo em vista a redução do uso de recursos, assim como a economia de tempo na triagem e identificação de compostos líderes.<sup>6,9-11</sup>

A ancoragem molecular (A.M.), também designada como atracamento ou docagem, é uma metodologia *in silico* essencial nessa perspectiva, uma vez que fornece o prognóstico dos modos de ligação de micromoléculas (ou macromoléculas) ao interagirem com um sítio receptor.<sup>12</sup> As poses (conformações e orientações) do ligante são encontradas por algoritmos de busca, enquanto que a classificação dessas soluções é conduzida em termos de afinidade pelo sítio de ligação via funções de pontuação (ou funções de *score*).<sup>2,12,13</sup>

Os valores numéricos obtidos pelas funções de pontuação são decorrentes da modelagem matemática das interações, que ocorrem durante a formação de complexos estáveis.<sup>2,14-16</sup> Por sua vez, as funções de pontuação podem ser empíricas, baseadas em campos de força e baseadas no conhecimento. Contudo, as simplificações matemáticas que deixam os cálculos de A.M. mais acelerados tornam as predições de afinidade desses complexos menos acuradas.<sup>17</sup> Consequentemente, para investigar detalhes energéticos das interações/ligações do sistema receptor-ligante, outros métodos computacionais devem ser combinados. Uma prática usual, e confiável, consiste na junção entre a A.M. e a Dinâmica Molecular (D.M.), aplicada ao complexo exportado.<sup>2,3,9,18</sup>

Em relação aos algoritmos de busca, se tem pelo menos duas categorias básicas: sistemática e estocástica.<sup>19</sup> Os algoritmos de busca “sistemáticos” são determinísticos, modelam o espaço de busca em intervalos limitados (predefinidos). Os algoritmos estocásticos amostram o espaço de busca por alterações aleatórias nas variáveis de estado até que o critério de término seja atendido.<sup>12,19</sup> Atualmente, os algoritmos estocásticos são considerados pela comunidade científica como mais hábeis na obtenção de soluções representativas, todavia Santos e colaboradores<sup>3</sup> afirmam que a comparação entre diferentes algoritmos de busca em *softwares* de A.M. não é uma tarefa linear, haja vista que diferentes métodos podem ser mais eficientes para uma classe de receptores que outras.

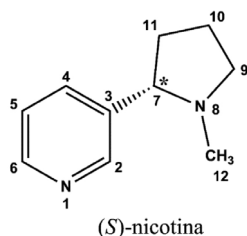
Entre os métodos estocásticos, podem ser destacados os algoritmos genéticos (A.G.).<sup>15,17,19-21</sup> Um A.G. leva essa alcunha por mimetizar o processo de evolução natural. Primeiramente, uma pose é qualificada como cromossomo, o que descreve a posição do ligante no espaço de busca. Uma população inicial de cromossomos é gerada aleatoriamente. Então, a população é submetida a uma série de operações genéticas: mutações (mudanças aleatórias nos cromossomos) e recombinações (mistura entre cromossomos), produzindo novas gerações de poses, as quais são inspecionadas por funções de pontuação que selecionam as mais aptas ao sítio receptor. A rotina é concluída após o desenvolvimento de um número adequado de gerações, parâmetro que é pré-definido pelo usuário.

\*e-mail: nailton.monteiro@unesp.br

<sup>a</sup>Laboratório de Química Medicinal, Síntese Orgânica e Modelagem Molecular (LaQMedSOMM)

A A.M. pode ser inserida em diversos seguimentos: processo de descoberta de fármacos, incluindo estudos de QSAR, triagem virtual em larga escala, elaboração de bibliotecas combinatorias, hipóteses de ligação para pesquisas em mutagenese, cristalografia de raios X no ajuste de substratos e antagonistas, dentre outros. No Brasil, existem muitos grupos de pesquisa importantes dentro dessa temática e que utilizam essas ferramentas em suas investigações. Apesar disso, nota-se que são insuficientes os materiais, no idioma português, sobre o *modus operandi* de como aplicar metodologias de A.M.

Portanto, nesta nota técnica, está elaborado um fluxo de trabalho simples para avaliação de um complexo receptor-ligante, por A.M., utilizando como modelo a estrutura do receptor nicotínico de acetilcolina humano  $\alpha 4\beta 2$  (PDB ID: 5kxi), resolvida por difração de raios X (3,9 Å), complexada à molécula de nicotina ( $K_i = 18,2 \pm 5,08 \text{ nmol L}^{-1}$ ).<sup>22</sup> Esquema 1.



**Esquema 1.** Representação esquemática 2D da estrutura química da nicotina em forma de linhas e identificação numérica dos átomos

Os receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChRs) são receptores do neurotransmissor endógeno acetilcolina, sendo divididos em dois grupos: musculares e neuronais.<sup>22</sup> O receptor neuronal subtipo  $\alpha 4\beta 2$  é majoritário no cérebro de mamíferos, sendo altamente sensível a exposição da molécula de nicotina (agonista). Outrossim, devido as suas funções biológicas estarem relacionadas com diversas desordens neurológicas, como Alzheimer, Parkinson, esquizofrenia e principalmente dependência química à nicotina, o entendimento das propriedades de interação receptor-ligante é fundamental na busca por formas terapêuticas.<sup>22</sup>

Visando um público de novos usuários, o texto compreende a instalação dos softwares utilizados (ver seção material suplementar 1S), obtenção e preparo da biomacromolécula e do ligante, realização dos cálculos de A.M., análise de resultados e o preparo de figuras para publicação. Para execução desse trabalho foram empregados softwares e servidores online de livre acesso e/ou versões acadêmicas. Não obstante, o pacote CSDS SYSTEM, contendo os softwares privados Mercury,<sup>23</sup> Hermes e GOLD,<sup>15,17</sup> foi obtido no domínio (dotlib.com.br), segundo a política de acesso vinculada ao Portal Periódicos CAPES.

É importante salientar que esse tutorial prático também possui o objetivo de atingir profissionais de outras áreas do conhecimento, debruçando-se em uma narrativa mais abrangente. Consequentemente, não serão abordados à fundo os aspectos teóricos, acerca dos problemas associados ao processo químico computacional. Advertimos, ainda, que a metodologia foi elaborada para utilização no sistema operacional Windows 10 (64 bits). Por fim, é seguramente aconselhado que, apesar da metodologia elaborada ser útil como um guia inicial, existe espaço para quaisquer aprimoramentos e/ou modificações, que visem atender, de forma mais adequada, outros problemas de A.M.

## PARTE EXPERIMENTAL

### Aquisição de estrutura 3D da biomacromolécula a partir do servidor online Protein Data Bank (PDB ID: 5kxi)

Ao acessar o domínio <https://www.rcsb.org/> na barra de busca,

deve-se inserir o código PDB 5kxi.<sup>22</sup> Uma vez redirecionado para a página que contém um resumo de informações sobre essa estrutura, o arquivo **PDB FORMAT** na opção **DOWNLOAD FILES** pode ser descarregado. Salve o arquivo (5kxi.pdb) em uma pasta criada especificamente para o trabalho.

### Análise das interações na estrutura cristalográfica com o servidor online PDBsum

Para avaliar as interações originais ligante-receptor, presentes na estrutura da biomacromolécula alvo, acesse o domínio <http://www.ebi.ac.uk/pdbsum/>, digite o código PDB 5kxi e clique em **FIND**.<sup>24</sup> Em seguida, na barra superior, se deve clicar na aba **LIGANDS** e selecionar o ligante que se deseja obter as interações com o sítio ativo [**NCT 402 (A)**]. Para descarregar o arquivo \*.pdf, contendo tais informações, clique com o botão direito do mouse sobre o símbolo PDF, em seguida clique em **salvar link como**, e escolha a pasta de trabalho.

### Avaliação da qualidade da estrutura cristalográfica com o servidor online PROCHECK

Acesse o domínio <https://saves.mbi.ucla.edu/>. Faça **upload** da estrutura cristalográfica obtida na etapa anterior (5kxi.pdb) e clique em **RUN PROGRAMS**. Em seguida, selecione a opção **PROCHECK**<sup>25</sup> e clique em **START**. Ao término do processo, clique em **RESULTS**. Após exibição dos resultados de análise, clique em **RAMACHANDRAN PLOT**.<sup>26</sup> Nesse momento, devem ser observados os resíduos em regiões permitidas ou "outliers", assim como o percentual de resíduos em cada uma dessas regiões (*favoured, allowed and outlier*). É possível fazer o download do arquivo \*.pdf contendo estas informações clicando no link **PDF**, localizado acima do gráfico de Ramachandran.

### Construção de ligantes utilizando o software BIOVIA Discovery Studio Visualizer

Abra o software Discovery Studio Visualizer (DSV)<sup>27</sup> e crie uma nova janela de trabalho **FILE > NEW > MOLECULE WINDOW**. Clique na guia **SMALL MOLECULES** e selecione a opção **SKETCH**, localizada na guia **SKETCH MOLECULES** do painel à esquerda da tela de trabalho.

**Obs.:** Para instruções/comandos básicos sobre a construção de moléculas, utilizando o DSV, ver seção material suplementar 2S.

### Construção da molécula de nicotina

- i) Com a opção **SKETCH** selecionada, desenhe o anel piridínico. Para criar ligações duplas, selecione a ligação desejada e aperte a tecla 2 no teclado (3 para ligações triplas). Alternativamente, com a opção **SKETCH** selecionada, clique sobre a ligação desejada (dois cliques para ligações triplas). Ainda, é possível selecionar todas as ligações simultaneamente com a tecla **shift** e mudar seus atributos em um único comando. Deve-se clicar com o botão direito do mouse sobre a seleção e pressionar a opção **BONDS**, localizando a lista de ligações disponíveis;
- ii) Para mudar um átomo de carbono por nitrogênio, selecione o átomo desejado e pressione a tecla "N". Neste caso, a função **SELECT** deve estar habilitada. Também é possível fazer essa mudança clicando com o botão direito sobre um átomo já selecionado e alterando-o em **ELEMENT**;
- iii) À esquerda da área de edição, clique em **H ADD** para adicionar hidrogênios e em **CLEAN GEOMETRY** para otimizar os ângulos

e as distâncias da molécula. O comando **CLEAN GEOMETRY** pode ser utilizado para otimizar uma subunidade da estrutura em particular;

- iv) Com a opção **SKETCH** ainda selecionada, clique no átomo de hidrogênio da posição 3 do anel piridínico e transmute-o para carbono, permitindo assim a construção do anel pirrolidínico. A seguir, adicione os hidrogênios utilizando a função **H ADD** (Figura 1).
- v) Clique em dois átomos de hidrogênio desse novo átomo de carbono para transmutá-los em mais dois átomos de carbono (seguido da adição dos hidrogênios). Faça isso mais uma vez, até que tenhamos 5 átomos de carbono, além do anel piridínico. Para fechar o ciclo, clique no primeiro átomo desejado e em seguida no segundo (ambos os cliques com a função **SKETCH** selecionada). Em seguida, clique em **CLEAN GEOMETRY**; **Atenção!** O hidrogênio ligado ao carbono terciário (C7) deve estar para cima em relação ao nitrogênio piridínico (N1). Selecione a função **TORSION** e altere o ângulo diedro formado pelos átomos “A”, “B”, “C” e “D”, mantendo o botão esquerdo do mouse pressionado (Figura 2A).
- vi) Selecione o átomo de carbono ( $sp^3$ ) da posição 8, ligado diretamente ao carbono terciário, e transmute-o em nitrogênio. Com a função **SELECT** habilitada, selecione o nitrogênio criado e clique sobre o mesmo com o botão direito do mouse. Em seguida, vá até a aba **CHARGE** e selecione a opção +1; **Atenção!** Quando um átomo de nitrogênio em configuração eletrônica  $sp^3$  forma três ligações, o mesmo possuirá um par de elétrons livres e carga zero. Contudo, no caso em questão, o átomo de nitrogênio N8 está protonado. Logo, esse átomo contribuiu com seu par isolado para formar uma quarta ligação, essa terá a natureza de ligação covalente coordenada. Como consequência, o N8 deve receber uma carga positiva, embora o mesmo seja mais eletronegativo que o átomo de H e o átomo de carbono C12 diretamente ligados a ele.
- vii) Com a função **SELECT** habilitada, clique no átomo de hidrogênio mais alto, ligado ao nitrogênio pirrolidínico N8, aqui referimo-nos ao átomo de H que está direcionado para o usuário conforme

indicado na Figura 2B, e transmute-o em carbono, seguido da adição de hidrogênios, Figura 2C;

**Atenção!** Para melhor representar a nicotina, isso é, na mesma orientação e conformação encontrada na estrutura cristalográfica (PDB ID: 5kxi),<sup>22</sup> é importante que o átomo de hidrogênio pirrolidínico, ligado ao nitrogênio, esteja direcionado para baixo do anel.

- viii) Sugere-se uma mudança no nome do ligante para “NCT” a fim de facilitar a análise posterior dos resultados de ancoragem molecular. Para isso, clique na seta que abre a janela de hierarquia e clique duas vezes sobre o nome da molécula. Altere o nome para NCT e pressione a tecla **Enter**. Em seguida, selecione toda a estrutura e utilize o comando **CLEAN GEOMETRY**. Salve a molécula em formato \*.mol2 (NCT.mol2) em **FILE > SAVE**.

### Espeiação *in silico* do estado de protonação do ligante, utilizando o MarvinSketch

Abra o *software* MarvinSketch<sup>28</sup> e construa a molécula de nicotina (ver material suplementar, seção 3S). Para simular o estado de protonação da nicotina em pH fisiológico, clique na aba **CALCULATIONS > PROTONATION > pKa**. Não faça nenhuma alteração na janela que se abre e pressione **OK > OK**. Selecione e mantenha pressionada a barra de rolagem até encontrar o pH 7,4, considerado como o valor de pH fisiológico padrão para esse tipo de predição. Observe que a micro-espécie mais significativa é a segunda (Figura 3), que corresponde à nicotina protonada no anel pirrolidínico.

### Otimização geométrica do ligante, por meio dos softwares CCDC Mercury e MOPAC2016

O cálculo de otimização geométrica da molécula de nicotina será conduzido em nível semi-empírico, utilizando o pacote MOPAC2016,<sup>29</sup> a partir da interface gráfica do *software* CCDC Mercury.<sup>23</sup> Assim, carregue no Mercury, o arquivo NCT.mol2. Para melhor visualização, sugere-se utilizar o estilo “bolas e bastões”,

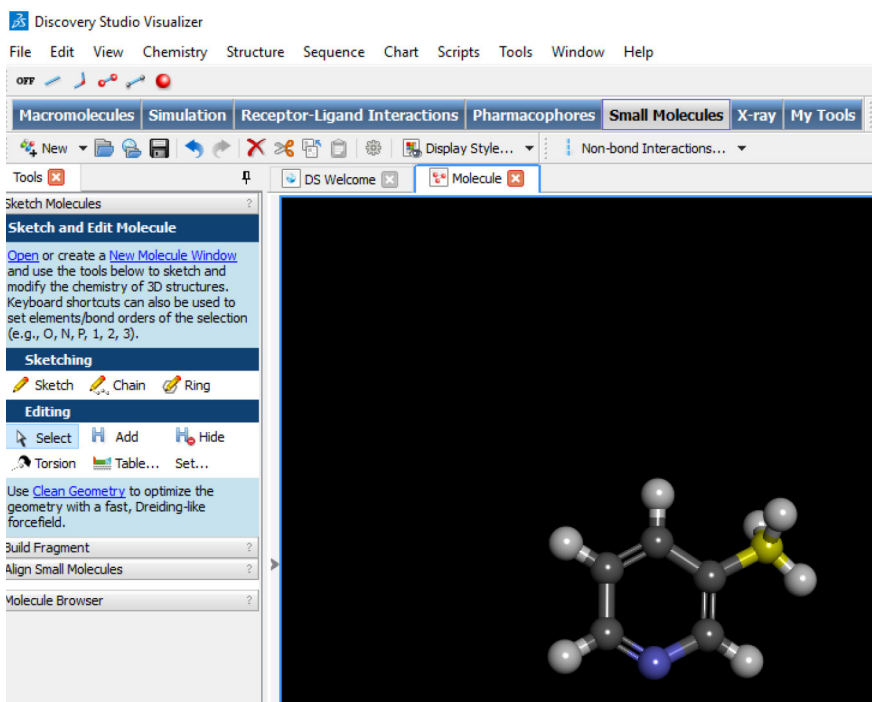
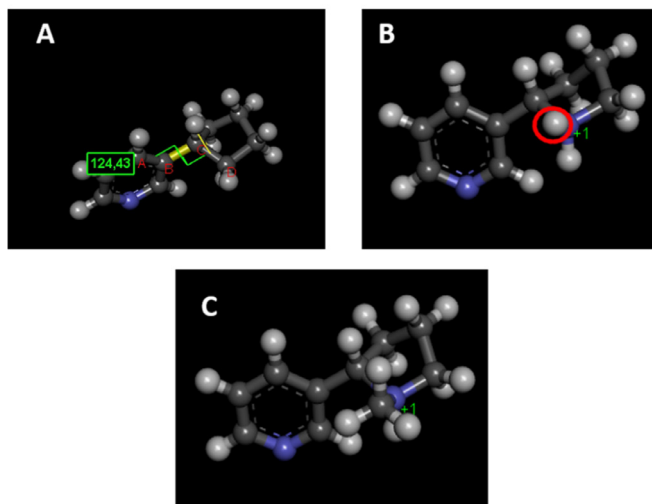


Figura 1. Posição do átomo de hidrogênio, transmutado para carbono (em amarelo, quando selecionado)



**Figura 2.** (A) Átomos envolvidos no ângulo diedro (ângulo de torção) entre os anéis da estrutura proposta. (B) Indicação do átomo de hidrogênio do nitrogênio N8, o qual deverá ser transmutado para carbono (C12) com posterior adição de hidrogênios. (C) estrutura da nicotina resultante

seleccione **DISPLAY > STYLES > BALL AND STICK**, na barra de ferramentas. Em seguida, para editar o arquivo de entrada do MOPAC2016, pressione consecutivamente **CSD-MATERIALS > CALCULATIONS > MOPAC** (Figura 4).

Na opção **MOPAC** clique em reticências [...] (Figura 5), e carregue o arquivo executável MOPAC2016.exe, previamente instalado.

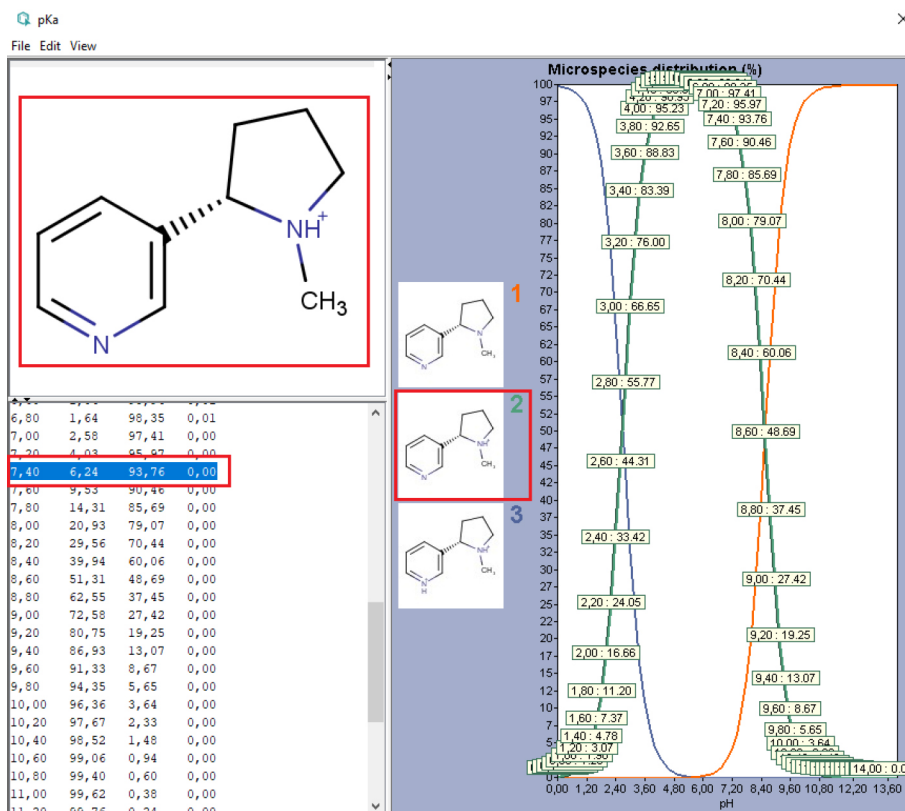
Para iniciar os cálculos de otimização geométrica, seleccione o hamiltoniano PM7 na opção **HAMILTONIAN**.<sup>30</sup> Marque as opções **OPTIMISE GEOMETRY** e **CALCULATE BOND ORDERS**. Digite os comandos **"CHARGE=+1"** e **"XYZ"** na caixa de texto **EXTRA KEYWORDS** e clique em **SUBMIT**. Escolha um local para salvar

os resultados do cálculo, com extensão \*.mol2. Sugere-se uma nova pasta, por exemplo **"ligantes\_do\_tutorial\_PM7"**.

### Ancoragem molecular

#### Redocagem da nicotina por meio do programa CCDC GOLD

- i) Inicialmente, inicie o *software* GOLD.<sup>15,17</sup> Automaticamente, a interface gráfica Hermes será acionada. Para realizar o carregamento da proteína de interesse siga **WIZARD > PROTEINS > LOAD PROTEIN** e seleccione o arquivo 5kxi.pdb. Nessa mesma janela, marque a opção **FIX ALL PROTEIN ROTABLE BONDS**, para trabalhar com a ancoragem molecular em modo rígido. Em seguida, ainda na mesma janela, clique na aba **5KXI** ao lado de **GLOBAL OPTIONS** e seleccione a opção **PROTONATION & TAUTOMERS**, clicando em seguida no botão **ADD HYDROGENS**, conforme demonstrado na Figura 6.
- ii) Em seguida, na opção **EXTRACT/DELETE WATERS**, delete todas as moléculas de água. (**Obs.:** Em muitos casos, moléculas de água funcionam como ponte, que medeiam interações, entre o ligante e resíduos-chave. Sendo assim, essas "águas" são importantes no cálculo de *docking* e sugerimos fortemente que seja realizada, previamente, uma inspeção visual, para confirmação. Ao confirmar a inexistência de tal condição, pode-se executar o procedimento de exclusão de todas as moléculas de água co-cristalizadas).
- iii) Após esse procedimento, na opção **DELETE LIGANDS**, marque todas as caixas de texto dos ligantes a serem removidos e clique na opção **EXTRACT**. Para cada ligante, o programa solicitará uma identificação e o diretório no qual o mesmo será salvo. Aqui é recomendado usar os nomes originais para os ligantes, salvando o ligante "A\_1" em um local de fácil acesso, tendo em vista que ele será usado como referência para os cálculos dos desvios (RMSD), na etapa de redocagem.



**Figura 3.** Janela com os resultados do cálculo de pKa



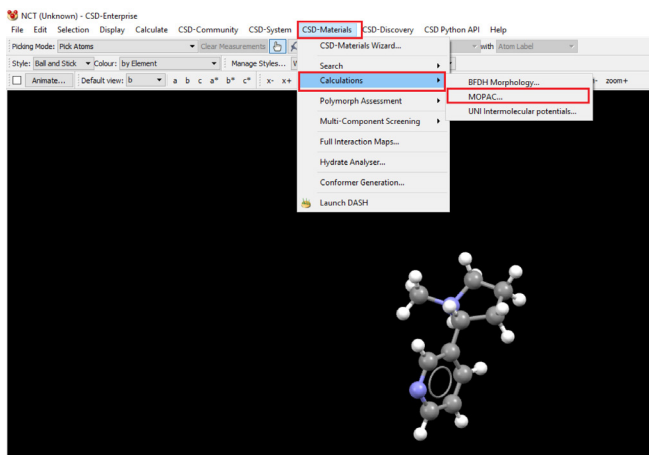


Figura 4. Iniciar o MOPAC pela interface do Mercury

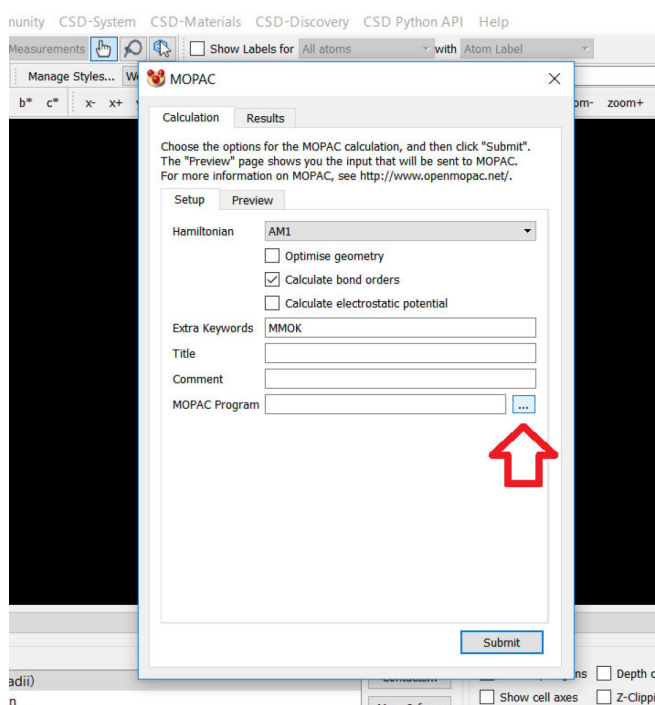


Figura 5. Carregar programa MOPAC pela interface do Mercury

iv) Retorne para a aba GLOBAL OPTIONS e clique na opção DEFINE BINDING SITE. Nessa janela, marque a opção POINT. Digite as coordenadas  $x = 67.3680$ ,  $y = -27.2034$  e  $z = -39.0781$  e clique em VIEW. (Obs.: As coordenadas  $x$ ,  $y$ ,  $z$  são definidas como a centro da esfera de simulações, a qual contempla o sítio de ligação. Neste tutorial escolheu-se um ponto que coincide exatamente com a posição cartesiana do átomo de nitrogênio pirrolidínico (N8) do ligante nicotina que está co-cristalizado na estrutura da biomacromolécula PDB ID 5kxi. Todavia, é importante destacar que para cada sistema se deve analisar a melhor posição com base, principalmente, em critérios experimentais). É possível alterar o raio a ser considerado para o sítio de ligação na caixa de texto **SELECT ALL ATOMS WITHIN**. Aqui, recomenda-se o raio de 10 Å para o cálculo. (Obs.: É possível medir o tamanho de uma molécula dentro do próprio Hermes. Para isso, clique na opção **SHOW HYDROGENS** na parte superior do software e em seguida mude o **PICKING MODE** para **MEASURE DISTANCES**. Feito

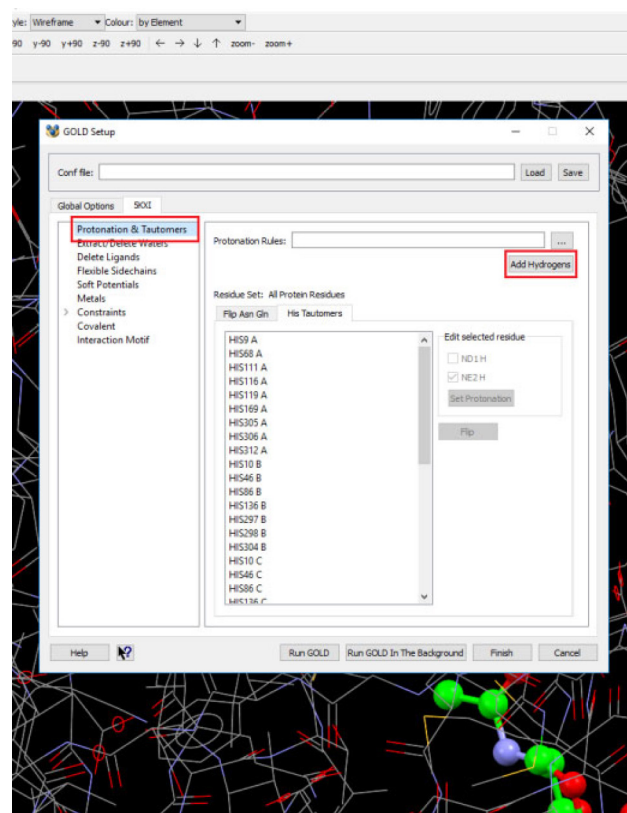


Figura 6. Adicionar hidrogênios à estrutura da proteína

isso, basta clicar sobre os dois átomos cuja distância se quer medir e o valor em angstrom aparecerá acima de uma linha tracejada na tela). O valor da distância medida pode ser verificado na forma de lista em **DISPLAY > MORE INFORMATION > DISTANCE LIST**.

- v) Alternativamente, é possível definir o sítio de ligação com base na posição de algum átomo de referência que se julgue adequado. No caso apresentado, o centro será definido nas coordenadas do nitrogênio pirrolidínico, do ligante de referência (“A\_1”). **Atenção!** É importante salientar que uma vez escolhida a referência para uma redocagem, deve-se mantê-la durante as ancoragens subsequentes (por exemplo, se estivermos usando “A\_1” como referência é imperativo **NÃO** usar “D\_1” para definir o sítio de ligação para outras simulações, dentro da mesma rotina de cálculo). Essa observação é desnecessária para cálculos subsequentes que utilizam o mesmo arquivo \*.conf gerado pela redocagem, entretanto, é de extrema importância na ocasião de ancoragens que sejam programadas do início, ou seja, novos arquivos \*.conf.
- vi) Na aba **DEFINE BINDING SITE**, com a opção **POINT** selecionada, minimize a janela **GOLD Setup** a fim de deixar visível a estrutura tridimensional da proteína na interface gráfica. Utilize os botões do mouse, esquerdo (rotacionar) e direito (aproximar ou afastar), para fazer com que toda a extensão da proteína fique visível no Hermes, (Figura 7):
- vii) Dentro da janela **MOLECULE EXPLORER**, na aba **DISPLAY**, é possível observar que o *software* ainda exibe os ligantes removidos. Clique duas vezes na *checkbox* ao lado de **ALL ENTRIES**, para que o Hermes esconda todas as estruturas. Em seguida, clique sobre a *checkbox* ao lado de “A\_1”.
- viii) Utilize o mouse para centralizar e aproximar a molécula visualizada, a fim de facilitar a seleção do átomo correto. Em sequência, clique no átomo de nitrogênio do anel pirrolidínico do ligante para defini-lo como centro do sítio de ligação. Feito isso, maxi-

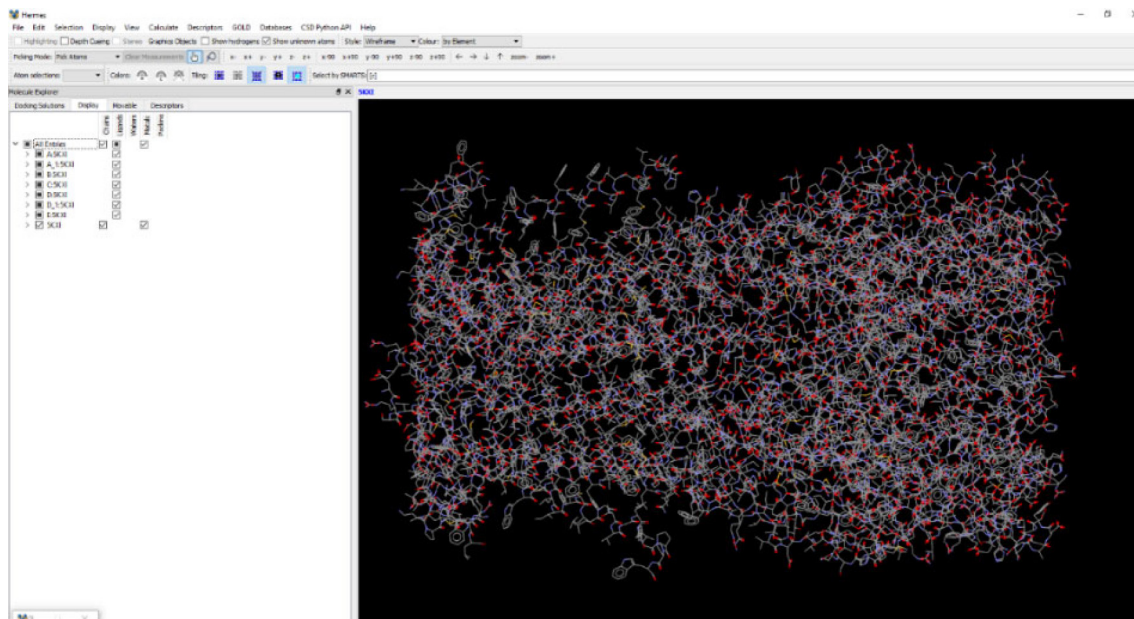


Figura 7. Visualização da estrutura da proteína no GOLD

mize a janela **GOLD setup** que deve estar localizada abaixo do **MOLECULE EXPLORER**. Se a definição for bem sucedida, uma esfera vermelha poderá ser visualizada ao redor do ponto em questão, quando a janela estiver maximizada. Além disso, as coordenadas obtidas devem ser as mesmas já mencionadas neste tutorial, mostradas na Figura 8.

- ix) Após a definição do sítio de ligação, dirija-se à opção **SELECT LIGANDS** e clique em **ADD**, para adicionar a molécula de nicotina, previamente otimizada (NCT.mol2). Idealmente, trabalha-se entre 50 e 100 poses de ancoragem, contudo, para esta nota técnica, selecione 10 poses de ancoragem. Posteriormente, clique nas reticências [...], ao lado de **REFERENCE LIGAND**, e selecione como referência o ligante extraído **A\_1**.
- x) Vá para a opção **FITNESS & SEARCH OPTIONS** e desmarque a opção **ALLOW EARLY TERMINATION** e selecione a função de pontuação CHEMPLP, em **SCORING FUNCTION**. O programa

GOLD contém 4 funções básicas de pontuação: GoldScore, ChemScore, CHEMPLP e ASP, sendo possível utilizá-las de forma exclusiva ou em conjunto, dependendo do objetivo do usuário. As funções são parametrizadas distintamente, de modo que é sempre necessário avaliar qual delas será mais eficiente para o sistema estudado.<sup>31</sup>

- xi) Em seguida, clique na opção **RUN GOLD**

Na janela que se abre, selecione a pasta na qual devem ser salvos os resultados (ex.: docking\_tutorial) e marque a caixa **PROTEIN** (caso a mesma esteja desmarcada) para salvar a estrutura preparada para o cálculo. Clique em **SAVE** para iniciar o cálculo, conforme mostrado na Figura 9.

Uma vez finalizado o cálculo, clique em **VIEW SOLUTIONS**. Em seguida, clique em **CLOSE** para fechar a janela do cálculo, fazendo o mesmo para a janela de programação do cálculo, deixando apenas a interface, Hermes, aberta. Os resultados

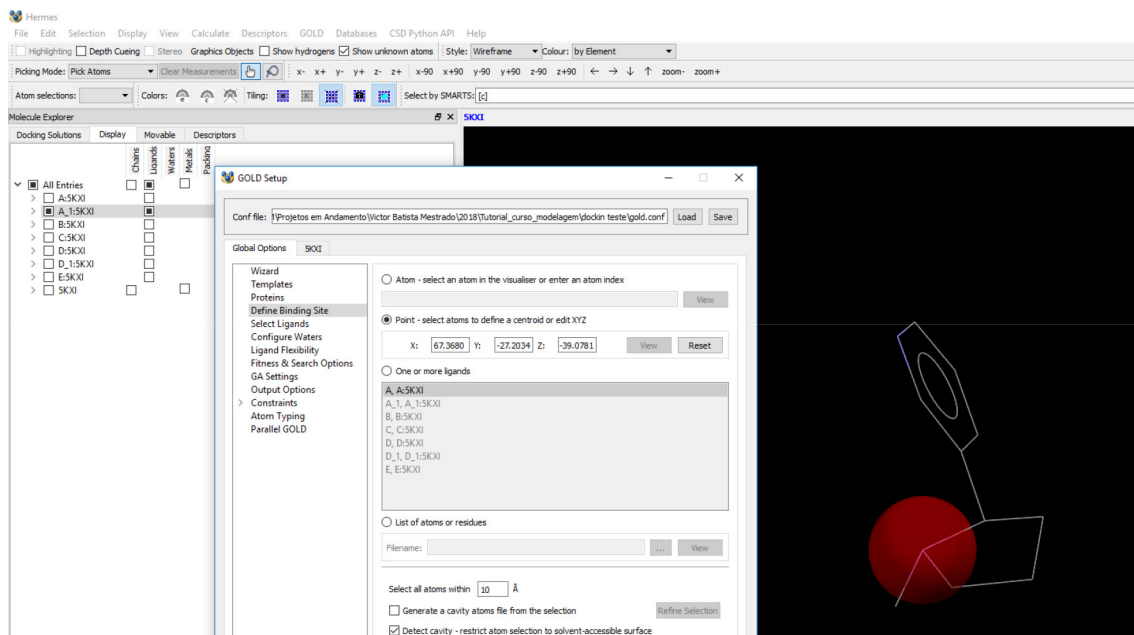


Figura 8. Ponto central da esfera de interação definido como sítio ativo da simulação

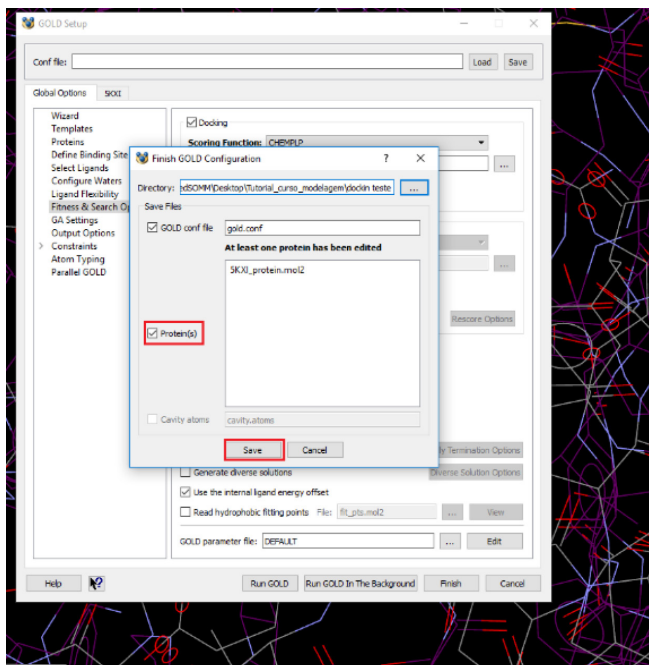


Figura 9. Confirmar início do cálculo das poses de ancoragem

serão mostrados na janela **MOLECULE EXPLORER**, na aba **DOCKING SOLUTIONS**, que deverá ser mostrada, automaticamente, após o término do cálculo. Os valores dos desvios médios quadráticos (em Å) obtidos entre as poses da molécula NTC e a referência **A\_1** podem ser visualizados arrastando a barra de rolagem dessa janela para o lado direito, Figura 10.

- xii) Seleccione o resultado com a maior pontuação (PLP.Fitness) e clique em **FILE > EXPORT COMPLEX > NOME\_DO\_ARQUIVO (EX.: COMPLEXOS\_EXPORTADOS) > SALVAR**. Todos os arquivos exportados do GOLD, no formato \*.mol2, podem ser abertos em qualquer computador, mesmo sem os arquivos de entrada elaborados previamente ao cálculo de ancoragem. Contudo, é importante salientar que outros arquivos obtidos no \*.conf não poderão mais ser abertos pelo GOLD se forem copiados para outras pastas, ou se as pastas forem renomeadas.

Por isso, é importante definir pastas exclusivas para os estudos de ancoragem, com nomes precisos, sem caracteres especiais e que não sejam pastas que precisam ter os arquivos transferidos.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Análise dos resultados da ancoragem molecular, utilizando o software DSV

Tão importante quanto a elaboração da metodologia computacional, a etapa de interpretação dos dados exportados, em estudos de ancoragem molecular, consiste na avaliação da orientação e conformação da micromolécula no sítio de ligação.<sup>32</sup> Além disso, consiste também em identificar quais são os resíduos chave e as forças intermoleculares que suportaram o reconhecimento complexo receptor-ligante.<sup>12,32</sup>

Nesse sentido, após o carregamento do arquivo exportado do GOLD, no software DSV, analisam-se tanto as interações intermoleculares quanto os demais parâmetros mencionados, utilizando a ferramenta **LIGAND INTERACTIONS**, a qual está disponível na aba **RECEPTOR-LIGAND INTERACTIONS**, conforme a Figura 11.

Resalta-se que essa ferramenta permite inspecionar os complexos obtidos, por cálculos A.M. e aqueles determinados experimentalmente, desde que haja um arquivo de entrada, contendo as coordenadas cartesianas atômicas, no formato \*.pdb.<sup>4</sup>

Na etapa de inspeção, após observar a conformação ativa do ligante, o usuário pode priorizar os contatos não-covalentes mais relevantes. Para tal, habilitando o painel de monitoramento do DSV, a aba **NON-BOND** permite ao usuário caracterizar as interações presentes no complexo, ao mesmo tempo, verificando quais são os parâmetros geométricos (distância e ângulo) associados. Na Tabela 1, podem ser visualizados alguns parâmetros geométricos, tipo de interação, cor atribuída e categoria das interações favoráveis, habitualmente listadas, em complexos receptor-ligante.

No exemplo em questão, o qual apresenta o menor valor para raiz do desvio-médio quadrático (RMSD  $\approx$  1,5 Å), pode ser observado que o ligante simulado (**NCT.mol2**) exibe uma pose (orientação e conformação) estabilizada no bolsão de ligação do receptor nicotínico de acetilcolina  $\alpha 4\beta 2$ , entre as interfaces  $\alpha$ - $\beta$ , a partir da formação de contatos não-covalentes com resíduos chave, Figura 12.

hbond	PLP part.metal	PLP part.nonpols	PLP part.repulsive	Reference.RMSD	Version
-1.0000	0.0000	-48.0295	0.0288	1.6075	0.0000
-1.0000	0.0000	-49.5015	0.0217	1.6027	0.0000
-1.0000	0.0000	-48.2512	0.0298	1.6046	0.0000
-1.0000	0.0000	-51.1858	0.0271	1.6069	0.0000
-1.0000	0.0000	-50.9417	0.0288	1.5860	0.0000
-1.0000	0.0000	-50.5942	0.0273	1.6024	0.0000
-1.0000	0.0000	-48.4728	0.0248	1.6030	0.0000
-1.0000	0.0000	-49.6116	0.0234	1.6075	0.0000
-1.0000	0.0000	-52.1343	0.0271	1.5973	0.0000
-1.0000	0.0000	-48.6827	0.0242	1.6137	0.0000

Figura 10. Janela de resultados

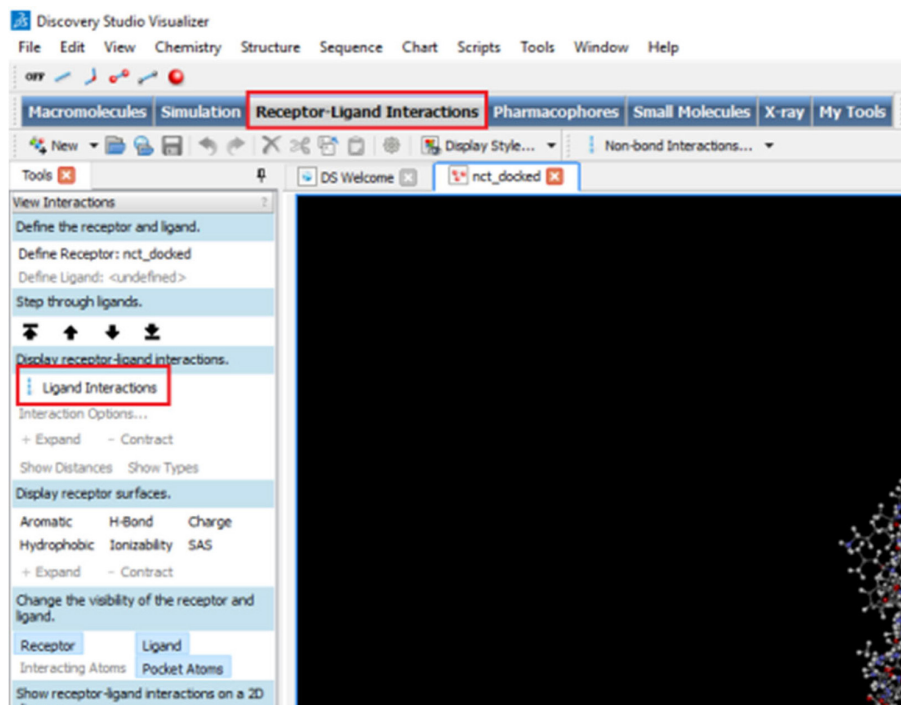


Figura 11. Localização da ferramenta Ligand interactions

Tabela 1. Algumas interações intermoleculares usualmente analisadas em complexos receptor-ligante. Os parâmetros geométricos e cores associadas estão de acordo com a configuração padrão do software DSV.<sup>27,33</sup>

Tipo de interação	Cor atribuída	Categoria	Parâmetros Geométricos	Descrição
Interações de hidrogênio	Verde Azul claro Laranja	Clássica; Não clássica; Ponte salina;	D-H...A (máx. 3,4 Å); D-H...A (máx. 3,8 Å); D-H...A (máx. 4,0 Å); A...A (máx. 3,0 Å);	$D\hat{H}A$ (mín. 90°; máx. 180°) D-H...A (A = aceitador); C-H...A/par isolado/ $\pi$ ; Interações de H entre grupos carregados;
Eletrostática	Laranja Laranja Laranja	Carga...carga; $\pi$ ...cátion; $\pi$ ...ânion;	(+)...(-) (máx. 5,6 Å); $\pi$ ...(+) (máx. 5,0 Å); $\pi$ ...(-) (máx. 5,0 Å);	- (Máx. 40°); (Máx. 40°); Interação entre cargas opostas; Interação de nuvem $\pi$ e grupo (ou átomo) carregado positivamente/negativamente;
Hidrofóbica	Roxa Rosa Rosa	$\pi$ ... $\pi$ ; Alquila; $\pi$ ...alquila; $\pi$ ...par isolado (PI)	Csp2...Csp2 (máx. 4,5 Å) Csp3...Csp3 (máx. 5,5 Å) Csp2...Csp3 (máx. 4,0 Å) Csp2...PI (máx. 3,0 Å)	(Máx. 90°; mín. 50°, face-à-face); (Máx. 90°, mín. 30°, forma T); - (Máx. 45° ± 20°); (Máx. 45° ± 40°); Interação entre nuvens eletrônicas $\pi$ deslocalizadas; Fraca interação $\sigma$ - $\sigma$ ; Fraca interação $\pi$ - $\sigma$ ; Fraca interação $\pi$ -PI (Par Isolado);
Interações de Halogênio	Laranja claro Laranja claro	F; Cl, Br e I;	C-F...A (máx. 3,7 Å); Cl, Br e I (X...A máx. $\leq \Sigma \text{vdW}(X, A) + 1$ Å);	$C\hat{F}A$ (min. 120°; máx. 180°); $C\hat{X}A$ (min. 120°; máx. 180°); Interações envolvendo cavidades- $\sigma$

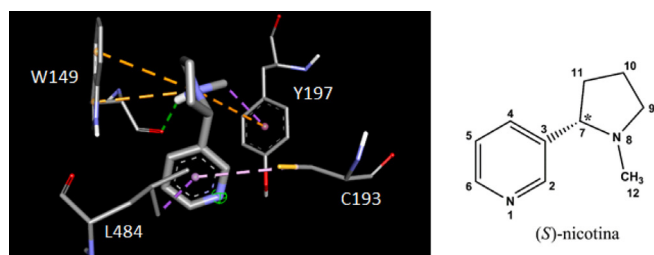


Figura 12. Tela de trabalho do DSV com o complexo nicotina- $\alpha 4\beta 2$  e esquema 2D da molécula de nicotina. As interações intermoleculares estão exibidas como linhas tracejadas, diferenciadas por cores em tipo e natureza (Verde = interação de hidrogênio clássica; Laranja = interação eletrostática; Roxa = Interações hidrofóbicas; Rosa = Interações parcialmente hidrofóbicas). Obs.: Para uma melhor visualização, apenas os hidrogênios polares são mostrados, CHEMISTRY > HYDROGENS > SHOW POLAR

Na tela de trabalho do DSV, as linhas tracejadas representam os contatos não-covalentes, sendo cada cor referente a uma categoria (natureza) de interação (ex. a linha tracejada verde indica a formação de uma interação de hidrogênio clássica do tipo D-H...A, sendo D = doador e A = aceitador). É importante salientar que o software DSV, em configuração padrão, utiliza essa paleta de cores tão-somente para diferenciar as interações. Todavia, o usuário poderá definir a cor da interação, clicando na coluna referente a cor na aba **NON-BOND** e selecionar aquela que melhor represente o sistema de interesse.

Como segue, o complexo nicotina- $\alpha 4\beta 2$  indica que o nitrogênio pirrolidínico (N8), o qual se encontra protonado, estabelece três interações de natureza eletrostática  $\text{cátion} \cdots \pi$  com os anéis aromáticos das cadeias laterais dos resíduos de W149 e Y197, Figura 12. Além disso, devido a protonação do átomo de N8, ocorre a formação de uma interação de hidrogênio clássica (N-H...O) com o átomo de O carbonílico da cadeia principal do resíduo de W149. Duas interações

hidrofóbicas do tipo  $\sigma\cdots\pi$  são observadas entre a metila, C12, e o anel aromático da nicotina com as cadeias laterais dos resíduos de Y197 e L484, respectivamente. Finalmente, um contato do tipo  $\pi\cdots\pi$  (par isolado) entre a subunidade aromática da nicotina e o átomo de enxofre presente na cadeia lateral do resíduo de C193 auxilia a estabiliza da nicotina no bolsão de ligação.

O algoritmo genético do *software* GOLD modula as orientações e conformações do ligante, visando encaixá-lo em um ou mais mínimos de energia do sítio ativo do receptor.<sup>15</sup> Prontamente, as populações de cromossomos são criadas e avaliadas pelos operadores genéticos (mutação, recombinação ou *crossover*), mapeando-se os parâmetros de geometria do ligante. Nessa conjuntura, o A.G. combina a sobrevivência entre as melhores soluções com intercâmbio de informações genéticas para formar estruturas heurísticas aperfeiçoadas, ou seja, os ligantes com melhores adaptabilidade (orientação e conformação) no sítio de ligação. Os valores das pontuações, compostas pela modelagem das interações receptor-ligante e afinidade, são conduzidas pela função de pontuação pré-definida pelo usuário.<sup>2,13-15,19</sup>

No exemplo em questão, foi aplicada a metodologia de redocagem para validação da rotina de cálculo empregada na simulação. É advertido que este protocolo tem maior eficiência em situações nas quais as moléculas otimizadas e o ligante co-cristalizado são estruturalmente similares.<sup>12,32</sup> Além disso, nessa metodologia é importante manter a estrutura da proteína fixa (rígida), a fim de garantir a conformação obtida experimentalmente, dos resíduos do sítio ativo. Nessa etapa, examina-se a capacidade do A.G. conduzir o ligante otimizado à conformação determinada pelo ligante co-cristalizado (reprodução do dado experimental). Na prática, o usuário deve, ao final do cálculo, observar os valores de RMSD com base na sobreposição das posições cartesianas dos átomos não-hidrogenóides, referentes as moléculas (simulada e original), no sítio de ligação. São plausíveis os protocolos com valores da raiz do desvio-médio quadrático não superiores a 2,0 Å.<sup>2,12,13,19,34</sup>

### Edição de figuras, utilizando o *software* PyMol

Para realizar a inspeção visual, ambos os arquivos (complexo exportado e a estrutura original 5kxi.pdb) são carregados no PyMol.<sup>35</sup> É importante destacar que a estrutura da biomacromolécula alvo pode ser obtida por homologia (modelagem molecular comparativa), no caso da ausência do arquivo 3D nos bancos de dados de proteínas (ver material suplementar, seção 4S).

Com o *software* PyMol aberto, as estruturas devem ser suprimidas:

**ALL > H > EVERYTHING.** Os ligantes de interesse são selecionados na barra de sequência, **DISPLAY > SEQUENCE**, sendo o ligante co-cristalizado denominado como **NCT** (localizado entre as cadeias A e B do receptor) e no complexo exportado o ligante é identificado como **UNK**, e está localizado no início da barra de sequência. Para facilitar a inspeção, na opção (**SELE**) a função S, “show”, é habilitada com posterior clique em **STICKS**. Por conseguinte, faz-se necessário remover os hidrogênios através da função **A “Action” > HYDROGENS > REMOVE**. Ainda, o usuário tem a opção de alterar a cor do plano de fundo para branco, **DISPLAY > BACKGROUND > WHITE**, Figura 13.

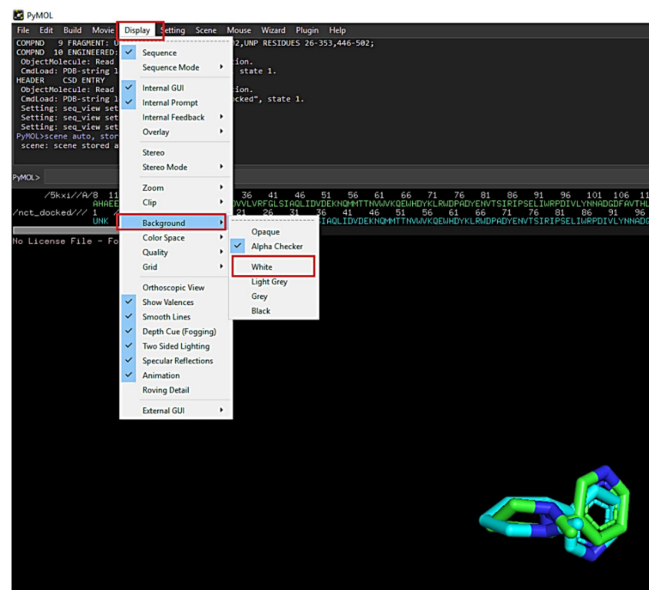


Figura 13. Moléculas de nicotina sobrepostas: simulada (C, em azul claro) e co-cristalizada (C, em verde), apresentadas como “sticks” e com os respectivos átomos de H suprimidos. Além disso, etapa de alteração do plano de fundo

Para expandir a seleção e apresentar as cadeias laterais dos resíduos que compõem o sítio de ligação, basta habilitar a proteína como “cartoon” (**ALL > S “SHOW” > CARTOON**) e clicar com o botão direito do mouse sobre o ligante co-cristalizado, seguindo **ACTIONS > EXPAND > BY 5 Å, RESIDUES**, conforme demonstrado na Figura 14.

Mantendo os resíduos selecionados, deve ser habilitada a função S, à direita da opção (**SELE**), optando pela forma **STICKS**.

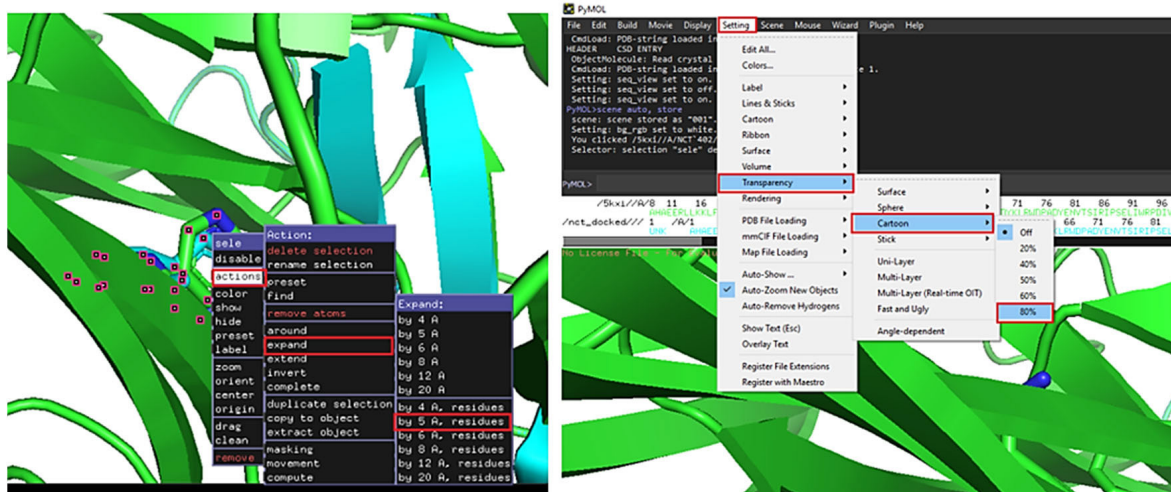


Figura 14. (Esquerda) Seleção e formatação dos resíduos, em um raio de 5 Å do ligante de interesse. (Direita) Aumento de transparência da estrutura em “cartoon”

Uma melhor visualização é adquirida alterando a cor do ligante co-cristalizado em relação aos resíduos previamente expandidos. Nesse sentido, mantenha-o selecionado aplicando em sequência o comando **C > BY ELEMENT**, escolhendo uma das cores do painel. Aqui, foi escolhida a coloração laranja para os átomos de carbono. Ao mesmo tempo, é sugerido o comando **SETTING > TRANSPARENCY > CARTOON > 80%**, para melhorar a visualização, conforme mostrado na Figura 14.

Antes de completar a edição da figura, podem ser coletadas as coordenadas da pose, segundo a visão atual na tela, com a palavra-chave **GET\_VIEW**, o qual deve ser digitada pelo usuário na linha de comando em frente ao nome “PyMol>”, pressionando a tecla **Enter** ao final do processo, Figura 15.

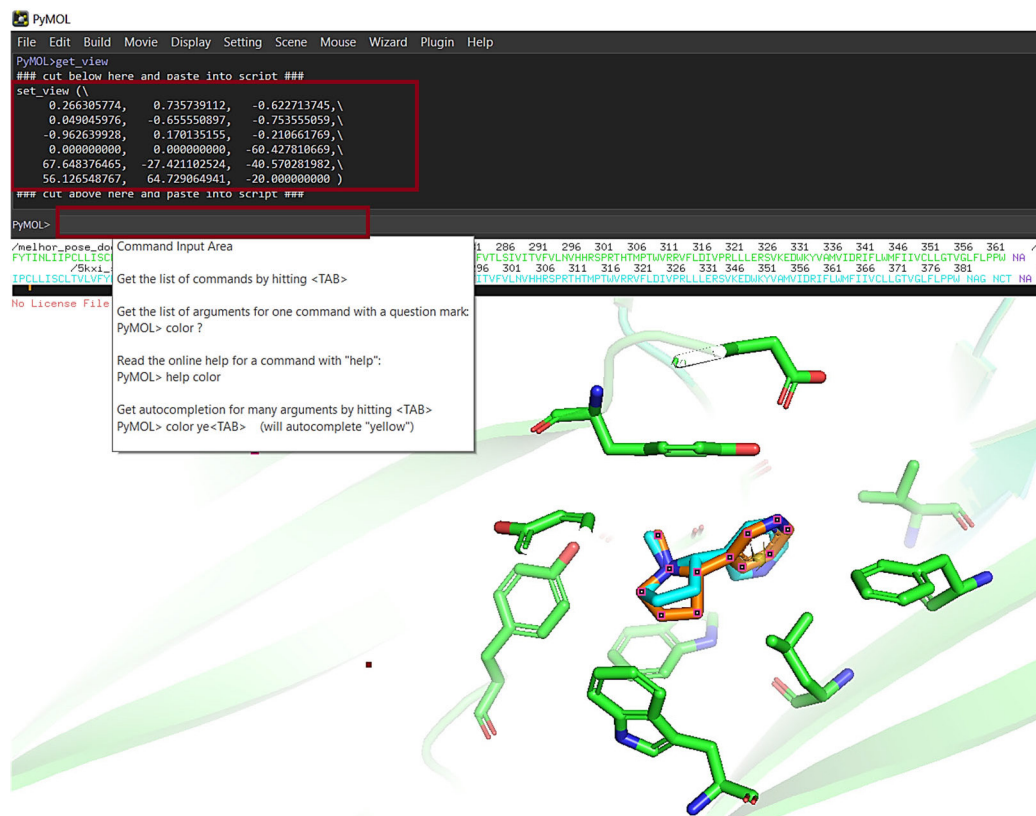
Essas coordenadas podem ser utilizadas, posteriormente, para analisar outros ligantes ancorados, com o mesmo receptor, a partir da mesma orientação. Para realizar esse procedimento, é suficiente colar,

Ctrl+V, as coordenadas já coletadas na linha de *input* dos comandos e pressionar a tecla **Enter**.

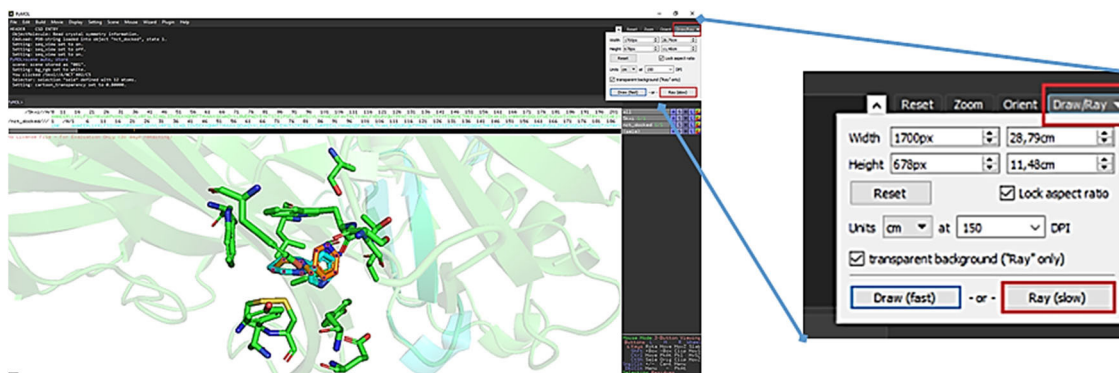
As rotinas de A.M. devem ser validadas, sendo a redocagem o método mais utilizado. Nessa abordagem, a estrutura do ligante co-cristalizado da proteína é removido do sítio de ligação. Em sequência, o algoritmo deverá recalculer a orientação e conformação do ligante no bolsão de ligação. Serão considerados protocolos aptos, ou bem sucedidos, caso haja concordância entre o modo de ligação experimental e o calculado. Aqui, a pose de maior pontuação apresentou valor de RMSD = 1,5 Å, isso é, RMSD < 2Å, considerada uma rotina apta para o sistema em questão.

Finalmente, para gerar uma figura de alta qualidade, visando relatórios técnicos, artigos, dentre outros, seleciona-se a opção **DRAW/RAY > RAY(slow)**, conforme exemplificado na Figura 16.

Quando o *software* terminar o cálculo, pressione **FILE>SAVE IMAGE TO FILE**, para salvar a imagem no diretório desejado. Para



**Figura 15.** Coordenadas cartesianas da pose de A.M. segundo a visão atual da tela; Linha de comandos do PyMol. Moléculas do ligante nicotina sobrepostas: simulada (C, em azul claro), co-cristalizada (C, em laranja) e resíduos do sítio de ligação (C, em verde) com no máximo 5 Å de distância do ligante. Todas as moléculas estão apresentadas como “sticks” e com os respectivos átomos de H omitidos para melhor visualização



**Figura 16.** Gerar figuras de alta qualidade com a função Ray

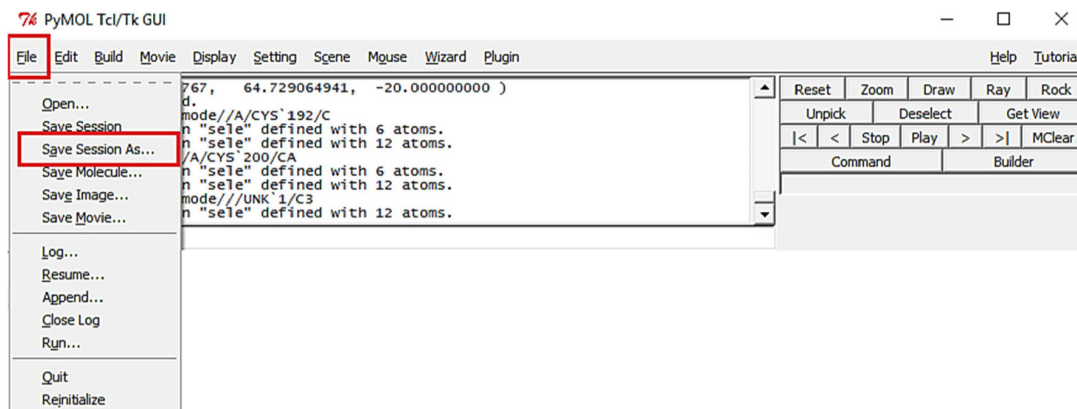


Figura 17. Salvar arquivo de sessão no PyMol

salvar um arquivo de sessão contendo as modificações feitas até o momento, siga os comandos **FILE > SAVE SESSION AS** e escolha o local desejado, Figura 17.

Obs.: A opção de nomear os resíduos de aminoácidos nesse *software* pode resultar em figuras poluídas visualmente. Portanto, é aconselhável identificar os resíduos, posteriormente, com um editor de imagem (ex. *Paint* ou *PowerPoint*).

## CONCLUSÕES

No decorrer deste texto, uma rotina computacional de fácil acesso e de baixo custo foi descrita, objetivando apresentar as principais etapas que pertencem a um procedimento de A.M., visando um público de usuários recentes e não especialistas. Nesse sentido, foram abordadas as etapas obtenção do arquivo 3D da biomacromolécula de interesse, construção e otimização do ligante, especificação do estado de protonação em pH fisiológico, condução da simulação de A.M. por meio do *software* GOLD, visualização do complexo receptor-ligante e monitoramento das interações intermoleculares via *software* DSV, concluindo com a edição de figuras de qualidade para publicação, utilizando o *software* PyMol.

Por fim, é fortemente reiterado que essa metodologia deve ser modificada, em algumas etapas, para resolução de problemas individuais de A.M. No entanto, o mesmo pode servir como um guia inicial aos interessados em SBDD.

## MATERIAL SUPLEMENTAR

O Material Suplementar citado ao longo do trabalho está disponível em <http://quimicanova.sbq.org.br>, em formato pdf, com acesso livre.

## AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001. Adicionalmente, agradecemos à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Projeto Regular, Processo 2018/00187-7, pelo apoio financeiro ao LaQMedSOMM, que foi fundamental para o desenvolvimento deste trabalho.

## REFERÊNCIAS

1. Anwar, T.; Kumar, P.; Khan, A. U. In *Molecular Docking for Computer-Aided Drug Design*, Coumar, M. S., ed.; Academic Press: Cambridge, 2021; cap. 1.

2. Amutha R.; Sangeetha B.; Muthukumar, R. In *A Theoretical Revisit on Molecular Modeling and Docking Approaches*, Coumar, M. S., ed.; Academic Press: Cambridge, 2021; cap. 1.
3. Santos, L. H. S.; Ferreira, R. S.; Caffarena, E. R. In *Integrating Molecular Docking and Molecular Dynamics Simulations*. Azevedo Jr, W. F., ed.; Humana Press: Totowa, 2019; cap 2.
4. Berman, H. M.; Westbrook, J.; Feng, Z.; Gilliland, G.; Bhat, T. N.; Weissig, H.; Shindyalov, I. N.; Bourne, P. E.; The Protein Data Bank; *Nucleic Acids Research* **2000**, *28*, 235.
5. Dai, W.; Zhang, B.; Su, H.; Li, J.; Zhao, Y.; Xie, X.; Jin, Z.; Liu, F.; Li, C.; Li, Y.; Bai, F.; Wang, H.; Cheng, X.; Cen, X.; Hu, S.; Yang, X.; Wang, J.; Liu, X.; Xiao, G.; Jiang, H.; Rao, Z.; Zhang, L.-K.; Xu, Y.; Yang, H.; Liu, H.; *Science* **2020**, eabb4489.
6. Sahoo, M.; Jena, L.; Daf, S.; Kumar, S.; *Genomics Inform.* **2016**, *14*, 104.
7. Moorthy, N. S. H. N.; Sousa, S. F.; Ramos, M. J.; Fernandes, P. A.; *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **2016**, *31*, 1428.
8. Dong, G.; Wu, Y.; Sun, Y.; Liu, N.; Wu, S.; Zhang, W. N.; Sheng, C.; *MedChemComm* **2018**, *9*, 1142.
9. Banerjee, R.; Perera, L. Viranga, T. L. M.; *Drug Discov. Today* **2021**, *26*, 804.
10. Mitsui, T.; Hirayama, K.; Aoki, S.; Nishikawa, K.; Uchida, K.; Matsumoto, T.; Kabuta, T.; Wada, K.; *Neurochem. Int.* **2010**, *56*, 679.
11. Bhutoria, S.; Ghoshal, N.; *J. Mol. Graphics Modell.* **2010**, *28*, 577.
12. Barreiro, E. J.; Fraga, C. A. M.; *Química medicinal: as bases moleculares da ação dos fármacos*, 3ª ed., Artmed: Porto Alegre, 2015.
13. Silakari, O.; Singh, P. K. In *Concepts and Experimental Protocols of Modelling and Informatics in Drug Design*, Silakari, O., Singh, P. K., eds.; Academic Press: Cambridge, 2021; cap 6.
14. Pagadala, N. S.; Syed, K.; Tuszyński, J.; *Biophys. Rev.* **2017**, *9*, 91.
15. Li, Z.; Gu, J.; Zhuang, H.; Kang, L.; Zhao, X.; Guo, Q.; *Appl. Soft Comput.* **2015**, *26*, 299.
16. Schneider, G.; Böhm, H.-J.; *Drug Discov. Today* **2002**, *7*, 64.
17. Chen, Y.-C.; *Trends Pharmacol. Sci.* **2015**, *36*, 78.
18. Bagheri, M.; Fatemi, M. H.; *J. Lumin.* **2018**, *202*, 345.
19. Morris, G. M.; Lim-Wilby, M.; *Methods Mol. Biol.* **2008**, *443*, 365.
20. Kang, L.; Guo, Q.; Wang, X.; *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2012**, *22*, 6568.
21. Morris, G. M.; Huey, R.; Lindstrom, W.; Sanner, M. F.; Belew, R. K.; Goodsell, D. S.; Olson, A. J.; *J Comput. Chem.* **2009**, *30*, 2785.
22. Morales-Perez, C. L.; Noviello, C. M.; Hibbs, R. E.; *Nature* **2016**, *538*, 411.
23. Macrae, C. F.; Sovago, I.; Cottrell, S. J.; Galek, P. T. A.; McCabe, P.; Pidcock, E.; Platings, M.; Shields, G. P.; Stevens, J. S.; Towler, M.; Wood, P. A.; *J. Appl. Crystallogr.* **2020**, *53*, 226.
24. Beer, T. A. P.; Berka, K.; Thornton, J. M.; Laskowski, R. A.; *Nucleic Acids Res.* **2014**, *42*, D292.

25. Laskowski, R. A.; MacArthur, M. W.; Moss, D. S.; Thornton, J. M.; *J. Appl. Cryst.* **1993**, *26*, 283.
26. Lovell, S. C.; Davis, I. W.; Arendall, W. B.; de Bakker, P. I.; Word, J. M.; Prisant, M. G.; Richardson, J. S.; Richardson, D. C.; *Proteins* **2003**, *50*, 437.
27. BIOVIA Dassault Systèmes; *BIOVIA Discovery Studio Visualizer*; San Diego, 2020.
28. ChemAxon; *MarvinSketch* v21.4, disponível em: <http://www.chemaxon.com>, acessada em setembro 2021.
29. Stewart, J. J. P.; *MOPAC2016; Stewart Computational Chemistry*: CO, USA, 2016.
30. Stewart, J. J.; *J. Mol. Model.* **2013**, *19*, 1.
31. Li, Y.; Han, L.; Liu, Z.; Wang, R.; *J. Chem. Inf. Model.* **2014**, *54*, 1717.
32. Batista, V. S.; Nascimento-Júnior, N. M.; *Med. Anal. Chem. Int. J.* **2018**, *2*, 000123.
33. Kemmish, H.; Fasnacht, M.; Yan, L.; *PLoS One* **2017**, *12*, e0177923.
34. Rocha, F. V.; Farias, R. L.; Lima, M. A.; Batista, V. S.; Nascimento-Júnior, N. M.; Garrido, S. S.; Leopoldino, A. M.; Goto, R. N.; Oliveira, A. B.; Beck, J.; Landvogt, C.; Mauro, A. E.; Netto, A. V. G.; *J. Inorg. Biochem.* **2019**, *199*, 110725.
35. Alexander, N.; Woetzel, N.; Meiler, J.; *International Conference on Computational Advances in Bio and Medical Sciences* **2011**, *2011*, 13.