

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
CURSO BIOTECNOLOGIA

Prospecção Virtual de potenciais inibidores da CYP51 de *Trypanosoma cruzi*

Mariana Reis Morais

Monografia apresentada à Coordenação do
Curso de Biotecnologia, da Universidade
Federal de Uberlândia, para obtenção do grau
de Bacharel em Biotecnologia.

Uberlândia
Agosto/2022

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
CURSO BIOTECNOLOGIA

Prospecção Virtual de potenciais inibidores da CYP51 de *Trypanosoma cruzi*

Mariana Reis Morais

Prof. Dr. Nilson Nicolau Júnior

Monografia apresentada à Coordenação do
Curso de Biotecnologia, da Universidade
Federal de Uberlândia, para obtenção do grau
de Bacharel em Biotecnologia.

Uberlândia
Agosto/2022

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
CURSO DE BIOTECNOLOGIA

Prospecção Virtual de potenciais inibidores da CYP51 de *Trypanosoma cruzi*

Mariana Reis Morais

Prof. Dr. Nilson Nicolau Júnior

Homologado pela coordenação do curso de
Biotecnologia em __/__/____

Prof. Dr. Nilson Nicolau Júnior

Uberlândia – MG
Agosto/2022

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
CURSO DE BIOTECNOLOGIA

Prospecção Virtual de potenciais inibidores da CYP51 de *Trypanosoma cruzi*

Mariana Reis Morais

Aprovado pela Banca Examinadora em: / / Nota: _____

Nome e assinatura do Presidente da Banca Examinadora

Uberlândia, 17 de agosto de 2022

*Dedico esse trabalho aos meus pais
por sempre acreditarem e apoiarem
meus sonhos, obrigada*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que estiveram ao meu lado durante essa jornada

Primeiramente, meus pais, por sempre estarem presentes, não teria chegado até aqui sem vocês

A toda minha família pelos momentos de alívio, visitas e carinho.

Em especial, ao meu avô, sei que de onde estiver torce por mim

A todos os meus amigos por serem meu refúgio e me motivarem todos os dias

Ao professor Nilson, por me acolher desde o primeiro momento e me orientar por esse caminho tão importante

RESUMO

Reconhecida pela Organização Mundial de Saúde (OMS) como uma das 17 doenças tropicais negligenciadas do mundo, a Doença de Chagas é ocasionada pela picada do triatomíneo (barbeiro) contaminado com o parasita *Trypanosoma cruzi*. Com elevada ocorrência na América Latina, a doença acomete cerca de oito milhões de indivíduos infectados mundialmente. Majoritariamente, a princípio, a doença não é acompanhada de sintomas, e os tratamentos sucedidos não apresentam especificidade, sendo responsáveis por fortes efeitos colaterais. Um alvo de fármacos já consagrado pela literatura contra doenças parasitárias é a esterol 14 α -demetilase (CYP51), devido sua capacidade de bloquear a formação do ergosterol, o qual está diretamente ligado ao bom funcionamento da célula. O objetivo desse trabalho é buscar potenciais novos inibidores para CYP51 por meio de triagem virtual, usando para tanto modelos farmacofóricos baseados na forma de inibidores já conhecidos. Os potenciais inibidores da CYP51 foram selecionados de bibliotecas de drogas, produtos naturais e moléculas *druglike*. Essas moléculas foram associadas a CYP51 por ancoragem molecular e analisadas quanto as propriedades farmacocinéticas. Os ligantes potenciais resultantes foram sugeridos como compostos líderes para posteriores análises *in vitro*, sendo eles NuBBE 558 e FDA 3873936.

Palavras-chaves: triagem virtual, CYP51, *Trypanosoma cruzi*

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. JUSTIFICATIVA	5
3. OBJETIVOS	6
3.1 Objetivo Geral	6
3.2 Objetivos Específicos	6
4. MATERIAL E MÉTODOS	6
4.1 Geração do modelo baseado em forma	6
4.2 Validação do modelo	7
4.3 Preparação do banco de dados	7
4.4 Triagem e Docking	9
4.5 Análise de propriedades farmacocinéticas <i>in silico</i>	9
4.6 Geração de diagramas de interação 2D proteína-ligante	10
5. RESULTADOS	10
5.1 Geração e validação do modelo baseado em forma	10
5.2 Preparação do banco de dados	13
5.3 Triagem e Docking	13
5.4 Análise de Propriedades Farmacocinéticas <i>in silico</i>	15
5.5 Geração de diagramas de interação 2D proteína-ligante	18
6. DISCUSSÃO	24
7. CONCLUSÃO	26

LISTA DE TABELAS

1. <i>Ranking</i> de moléculas com melhor pontuação CHEMPLP na ancoragem molecular do banco de dados NuBBE	14
2. <i>Ranking</i> de moléculas com melhor pontuação CHEMPLP na ancoragem molecular do banco de dados CL	14
3. <i>Ranking</i> de moléculas com melhor pontuação CHEMPLP na ancoragem molecular do banco de dados EXP	14
4. <i>Ranking</i> de moléculas com melhor pontuação CHEMPLP na ancoragem molecular do banco de dados ZINC	15
5. <i>Ranking</i> de moléculas com melhor pontuação CHEMPLP na ancoragem molecular do banco de dados FDA	15
6. Resultados pkCSM banco de dados NuBBE e comparação com a piridina	16
7. Resultados pkCSM banco de dados CL e comparação com a piridina	17
8. Resultados pkCSM banco de dados EXP e comparação com a piridina	17
9. Resultados pkCSM banco de dados ZINC e comparação com a piridina	18
10. Resultados pkCSM banco de dados FDA e comparação com a piridina	18

LISTA DE FIGURAS

1. Ciclo de infecção do <i>Trypanosoma cruzi</i> , causador da Doença de Chagas	2
2. Interação da CYP51 de <i>T. cruzi</i> em complexo com o inibidor de piridina	11
3. Modelo farmacofórico, construído a partir do programa vROCS	11
4. Curva AUC	12
5. Representação em 2D do ligante NUBBE 558	19
6. Visualização do ligante NUBBE 558 no <i>Discovery Studio Visualizer</i>	20
7. Representação em 2D do ligante CL 401757	20
8. Visualização do ligante CL 401757 no <i>Discovery Studio Visualizer</i>	21
9. Representação em 2D do ligante EXP 299181	21
10. Visualização do ligante EXP 299181 no <i>Discovery Studio Visualizer</i>	22
11. Representação em 2D do ligante ZINC 08133202	22
12. Visualização do ligante ZINC 0133202 no <i>Discovery Studio Visualizer</i>	23
13. Representação em 2D do ligante FDA 3873936	23
14. Visualização do ligante FDA 3873936 no <i>Discovery Studio Visualizer</i>	24

1. INTRODUÇÃO

A infecção por *Trypanosoma cruzi* é responsável pela Doença de Chagas, causada pela picada do inseto Triatominae. Em todo mundo, estima-se que cerca de 8 milhões de pessoas estejam infectadas, grande parte na América Latina (MANUAL MSD, 2019). Mesmo apresentando um alto número de casos, as opções terapêuticas são limitadas, e atualmente, determina-se apenas dois medicamentos: Benzonidazol (BZN) e Nifurtimox (FERREIRA et al., [s.d.]). Entretanto, são responsáveis por fortes efeitos colaterais, como gastrointestinais e neurais (CASTRO; MONTALTO; BARTEL, 2006). Assim, existe uma necessidade urgente de novos fármacos eficazes e seguros que possam combater essa doença de forma efetiva. A Doença de Chagas, gradativamente, transforma-se em um problema de saúde pública em áreas não-endêmicas, devido ao crescente movimento populacional e emigração de indivíduos infectados.

A forma de transmissão mais recorrente para os humanos é por meio da picada do inseto vetor infectado pelo parasita, o qual está presente na ordem Hemiptera, família Reduviidae e subfamília Triatominae, popularmente chamado de barbeiro. Essa família é composta de cerca de 150 espécies, sendo que 5 delas são importantes na transmissão do parasita, que são: *Triatoma infestans*, *T. dimidiata*, *T. brasiliensis*, *T. sordida*, *Rhodnius prolixus* e *Panstrongylus megistus*. Ademais, em torno de 100 espécies de mamíferos selvagens garantem o ciclo infeccioso do *T. cruzi* na natureza (VIÑAS, 2010). O inseto infectado, ao picar o indivíduo, deposita suas fezes quando o vetor se alimenta, adentrando o corpo do hospedeiro por meio de lesões na pele, mucosa, olhos ou boca e caem na corrente sanguínea. A partir desse momento ocorre a contaminação e reinício do ciclo de vida do protozoário (TYLER; ENGMAN, 2001).

Além disso, a transmissão pode ocorrer por transfusão sanguínea e de órgãos, infecção de mãe para filho, alimentos contaminados e acidentes de laboratório (JR; RASSI; MARIN-NETO, 2010).

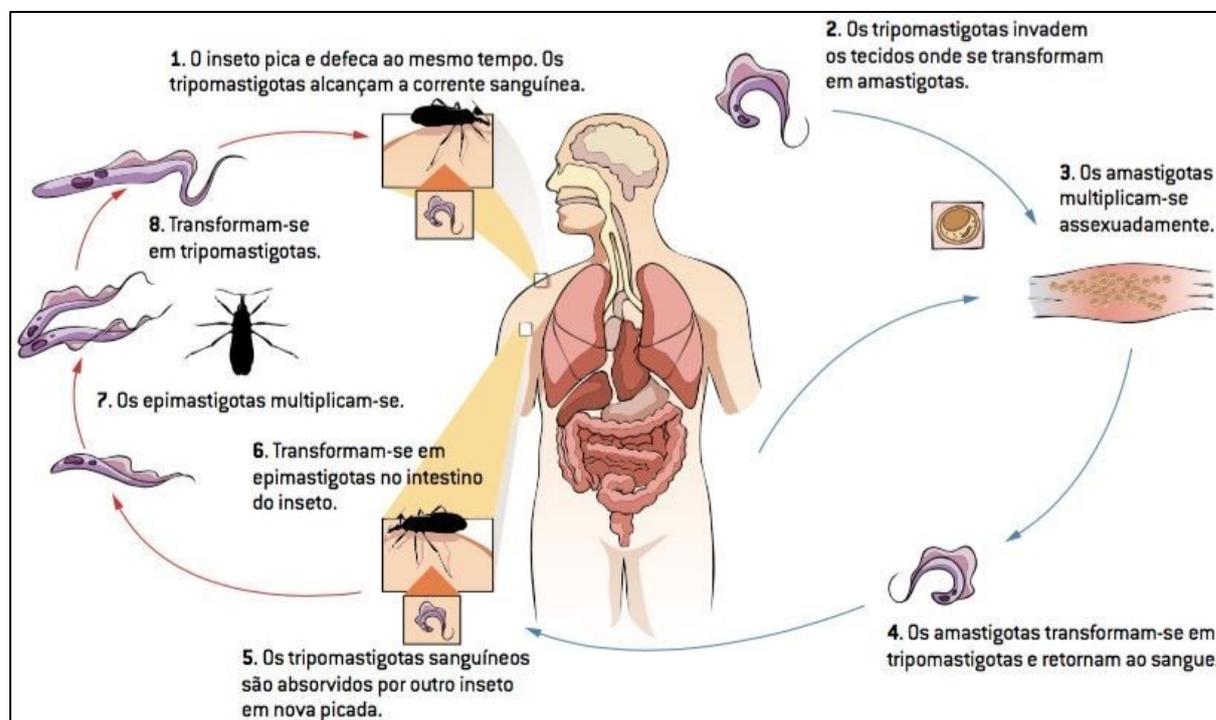


Figura 1: ciclo de infecção do *Trypanosoma cruzi*, causador da Doença de Chagas

A Doença de Chagas pode acontecer em três etapas: aguda, indeterminada e crônica. A fase aguda pode causar uma febre rápida e levar à morte devido ao quadro de miocardite. No caso da fase indeterminada o paciente não apresenta sintomas e a etapa crônica ocorre em 20-30% dos casos e pode durar anos com complicações cardíacas e gastrointestinal (MANUAL MSD, 2019). Os fármacos existentes são capazes de curar a doença apenas em sua fase inicial, obtendo um sucesso de 76% (BURLEIGH; ANDREWS, 1998; CANÇADO, 2002; COURA; CASTRO, 2002; TYLER; ENGMAN, 2001).

O citocromo P450 é pertencente a superfamília de hemoproteínas, as quais são vistas em procariotos e eucariotos encontrados em diferentes reinos, e possui a função de coordenar

processos de transferência de elétrons (SUETH-SANTIAGO, 2015). Ademais, as enzimas do citocromo P450 são caracterizadas pela presença do grupo heme, um grupo prostético que contém a presença de um íon ferroso, o qual está complexado por nitrogênios de um anel chamado porfirina, e essa estrutura se encontra ancorada na enzima por meio da ligação entre um átomo de enxofre e um átomo de ferro (MACK et al., 2003).

Um dos procedimentos realizados pelas enzimas do Citocromo P450 é a inserção de um átomo de oxigênio, resultando em compostos hidroxilados que apresentam uma polaridade maior. Esse método pode ser empregado em substâncias endógenas, como os esteroides, e na oxidação de xenobióticos como fármacos e toxinas (SUETH-SANTIAGO, 2015).

Os esteroides, um dos substratos encontrados nas enzimas do Citocromo P450, são responsáveis pela manutenção biológica da membrana celular, possuem influência na fluidez, integridade e permeabilidade, ou seja, são indispensáveis para a integridade e bom funcionamento da célula (BROWN, 1998). A biossíntese dos esteróis possui um intermediário em comum entre os reinos, o óxido de esqualeno. A partir dele a rota biossintética se divide em: reino animal, o principal esteroide é o colesterol, e nos fungos e parasitários, o principal esteroide é o ergosterol (SUETH-SANTIAGO, 2015).

Pesquisas em relação a síntese de moléculas que possam estar presentes nos tratamentos da Doença de Chagas vêm ganhando espaço no mundo científico, principalmente após o sequenciamento de novos alvos encontrados no *Trypanosoma cruzi* (AZEVEDO, 2009). Ademais, um segundo alvo de elevada importância das pesquisas atualmente é a biossíntese de esteróis, visto que no caso da *T. cruzi*, são caracterizados como um papel importante para a integridade da célula (HARGROVE et al., 2013).

Um dos inibidores de aplicação no tratamento de pacientes com Doença de Chagas com maior destaque da biossíntese do ergosterol são os compostos derivados azólicos da classe triazóis. Esses são capazes de agir sobre a CYP51 impedindo a formação do intermediário zimosterol, o qual, conseqüentemente, impede a formação do ergosterol. Ao final da inibição ocorre um acúmulo de precursores biossintéticos na membrana, comprometendo seu funcionamento (SUETH-SANTIAGO, 2015). Assim, visto que as células humanas são dependentes de colesterol e não de ergosterol, esta via bioquímica apresenta grande destaque para viabilização de tratamentos. Trabalhos presentes na literatura mostram que o protozoário da doença é suscetível a diversos inibidores da síntese de ergosterol, tanto *in vitro* como *in vivo* (URBINA, 2009; FRANÇA, 2014).

Os avanços tecnológicos, cada vez mais, auxiliam na pesquisa e desenvolvimento de fármacos. O Design de Drogas Auxiliado por Computador (CADD) mostra-se presente e essencial, a partir de métodos rápidos e eficientes na busca dos melhores ligantes, em meio a grande quantidade de conhecimento de sequências genômicas e moléculas biológicas tridimensionais, conclui, assim, resultados com alta confiabilidade *in silico* (SHANMUGAM; JEON, 2017). Essa nova técnica permite que cientistas estudem novas drogas sem a preocupação com tempo e investimento desperdiçados (OOMS, 2000).

O processo de buscar ligantes contra um determinado alvo biológico *in silico* é denominado Triagem Virtual (*Virtual Screening* – VS). Esse método utiliza dos cálculos computacionais para averiguar as distâncias tridimensionais entre os modelos farmacofóricos e comparar com as moléculas apresentadas, de modo que é possível prever o alvo com maior coeficiente de inibição. Tem-se por modelo farmacofórico, “texto traduzido”, é “O conjunto de características

estéricas e eletrônicas que são necessárias para garantir a interação supramolecular ótima com um alvo biológico, e acionar – ou bloquear – sua resposta biológica.” (WERMUTH et al., 1998).

Para o desenvolvimento de novos fármacos com atividades antiparasitárias há dois problemas comumente encontrados: a seletividade do fármaco é difícil de ser atingida sem que tenha consequências colaterais e apenas um alvo não é o suficiente para que tenha o melhor resultado desenvolvido (SUETH-SANTIAGO, 2015).

A CYP51 é representada por um problema de seletividade devido a quantidade de enzimas com semelhanças estruturais encontradas tanto no parasito como no hospedeiro. Além disso, mesmo com baixa similaridade das enzimas, a estrutura do grupo heme se mantém como isoforma. Esses fatos, em longo prazo, podem levar a efeitos como hepatotoxicidade e intoxicação (SUETH-SANTIAGO, 2015). Percebe-se que as pesquisas de potenciais ligantes antiparasitários azólicos, inibidores da CYP51, deve ocorrer de forma sistemática a fim de diminuir os efeitos colaterais e análise da toxicidade.

2. JUSTIFICATIVA

Visto que não existem fármacos efetivos contra a Doença de Chagas, e dado os importantes efeitos colaterais das poucas drogas disponíveis, o presente trabalho visa buscar novos potenciais inibidores que apresentem características farmacocinéticas aceitáveis e que, portanto, sejam menos deletérias que as atuais.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Triagem virtual visando sugerir potenciais moléculas líderes, contra a CYP51 de *T. cruzi*, para desenvolvimento de novas drogas contra a Doença de Chagas.

3.2. Objetivos Específicos

- Construir e validar um modelo farmacofórico a partir de estruturas extraídas do banco de dados PDB em complexo com a proteína CYP51 de *T. cruzi*;
- Observar as interações entre o receptor, CYP51, e dos compostos retirados nas triagens dos bancos de dados, a partir de ancoragem molecular;
- Analisar as propriedades farmacocinéticas *in silico* dos compostos de melhores resultados;
- Sugerir ligantes com potencial de inibirem a CYP51.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Geração do modelo baseado em forma

A construção do modelo farmacofórico permite o planejamento de drogas sintéticas, por meio da análise da região da molécula na qual o ligante está intimamente relacionado com seu receptor. Assim, o modelo foi gerado a partir de inibidores conhecidos na literatura, que abrangem as características necessárias para a inibição da evolução do parasita. A extração

desses inibidores foi realizada por meio do banco de dados do Protein Data Bank (PDB) (BERMAN, 2000), de modo que foram escolhidas 6 moléculas, cujos códigos de identificação são 3KSW, 3ZG2, 3ZG3, 4H6O, 4UVR e 5AJR. Essas moléculas foram analisadas de acordo com os resultados obtidos pelo score final submetido ao software vROCS 3.2.0.4, OpenEye Scientific Software, Santa Fe, NH (HAWKINS; SKILLMAN; NICHOLLS, 2007) nessa etapa, aqueles que apresentaram características indesejáveis foram descartados.

4.2. Validação do modelo

A validação do modelo foi realizada por meio do programa vROCS 3.2.1.4 Software, Santa Fe, NM (HAWKINS et al., 2010), técnica responsável pela triagem de cerca de 800 confôrmeros por segundo. De modo que foi analisado a área sobre a curva (AUC) da curva Receiver Operating Characteristic (ROC) como característica classificatória, na qual valores $\geq 0,8$ foram considerados aceitáveis. Essa curva demonstra a equiparidade entre os compostos ativos e os inativos escolhidos de forma aleatória. Dessa forma, foi preparado dois bancos de dados, ativos ou azoles e inativos ou decoys. Os compostos ativos foram retirados do artigo Reddy et al., 2013. Enquanto os decoys foram gerados na plataforma online DUD-E (MYSINGER et al., 2012) o qual baseia-se nos ligantes ativos para construção dos modelos inativos.

4.3. Preparação do banco de dados

O modelo que apresentou melhor resultado, referente a etapa anterior, construído a partir do programa vROCS, foi usado na triagem virtual de bibliotecas de compostos originários de cinco bancos de dados. O primeiro deles é conhecido pela característica de moléculas oriundas

de produtos naturais brasileiros (NuBBE). O segundo banco de dados é chamado ZINC (IRWIN et al., 2012), conhecido como DrugsNow de posse de aproximadamente 10 milhões de compostos. O terceiro banco de dados foi o FDA (Federal Drug Administration) e os bancos de dados CL (Core Library) e EXP (Express Pick), sendo esses dois últimos da empresa Chambridge. Essas bibliotecas foram submetidas ao software FILTER do OMEGA 2.5.1.4 OpenEye Scientific Software, Santa Fe, NM (HAWKINS et al., 2010). O programa FILTER é responsável por realizar de forma rápida a filtragem e seleção dos compostos, por meio de uma combinação de cálculos de propriedades físicas e estudo de grupos funcionais. Ao utilizá-lo foi eliminado os compostos indesejáveis, como aqueles que apresentaram funções tóxicas, com baixa biodisponibilidade oral, com alta facilidade de formar ligações covalentes com o alvo e compostos que podem causar interferências durante o ensaio experimental.

Os compostos resultantes dessa filtragem foram sujeitos ao programa QUACPAC 1.6.3.1, OpenEye Scientific Software, Santa Fe, NM (<http://www.eyesopen.com>), com o objetivo de obtenção de compostos com cargas precisas ou que sejam retratadas em uma forma de maior consistência. Assim, o QUACPAC busca e enumera o pKa, que apresenta compatibilidade com o sangue, e os tautômeros de cada composto, visando a obtenção das protonações corretas.

Por fim, a biblioteca de compostos foi submetida à geração de confôrmeros a partir do programa OMEGA. Por meio dele é possível obter os bancos de dados de multi-confôrmeros bioativos com alta rapidez e credibilidade. Essa etapa é de extrema importância para resultados de modelos farmacofóricos satisfatórios, durante a triagem virtual, pois esses dependem das conformações bioativas.

4.4. Triagem e Docking

A triagem foi realizada a partir do software ROCS 3.2.1.4 Software, Santa Fe, NM (HAWKINS et al., 2010) e o modelo validado, empregando os scores *Tanimoto combo*, *color force field*: *Implicit Mills-Dean* analisando-se os 500 melhores resultados. Os dados foram visualizados por meio do software VIDA 4.3.0 Software, Santa Fe, NM.

As bibliotecas de compostos geradas a partir da busca pelo modelo foram sujeitas à técnica de ancoragem molecular. Dessa forma, essa etapa foi realizada utilizando o programa GOLD (VAN ZANTEN, 2012) que avalia a ancoragem flexível entre as proteínas e os ligantes. A partir de um algoritmo genético, esse programa é responsável por encontrar soluções por meio de ancoragem ramificando inúmeras cópias de modelos flexíveis do ligante no sítio ativo do receptor, redefinindo segmentos dessa cópia de forma aleatória até que seja gerado um conjunto convergido de estruturas. O algoritmo de pontuação e ranqueamento usado foi o CHEMPLP.

4.5. Análise de Propriedades Farmacocinéticas *in silico*

Após os compostos serem avaliados na ancoragem, o software online pkCSM (PIRES; BLUNDELL; ASCHER, 2015) estimulou as características principais de propriedades farmacocinéticas, sendo elas absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade (ADMET) a fim de manifestar modelos de regressão e classificação preditivos. Essa etapa é de importante aspecto para que seja enunciado se, os potenciais inibidores em vista, possuíram os parâmetros ideais para seleção de drogas, de acordo com o organismo humano.

4.6. Geração de diagramas de interação 2D proteína-ligante

Com o auxílio do programa LigPlot⁺ (LASKOWSKI, 2011) foi construído diagramas 2D da interação ligantes-CYP51, com o intuito de mostrar quais interações intermoleculares resultam da abordagem da ancoragem.

5. RESULTADOS

5.1. Geração e validação do modelo baseado em forma

Os inibidores 3KSW, 3ZG2, 3ZG3, 4H6O, 4UVR e 5AJR foram extraídos do Protein Data Bank (PDB) e analisados por meio do software vROCS 3.2.1.4, OpenEye Scientific Software, Santa Fe, NH (HAWKINS et al., 2010) a partir da construção da curva AUC. O inibidor que apresentou melhor resultado foi a molécula 3ZG3 (Fig. 2) e, a partir dessa, foi possível a visualização das interações intermoleculares entre a esterol 14- α demetilase (CYP51) de *Trypanosoma cruzi* e o inibidor de piridina no complexo proteína-ligante para a construção do modelo farmacofórico (Fig. 3). O inibidor 3ZG3 apresenta um complexo com a piridina, na qual a ligação entre ferro que está presente no grupo heme com o nitrogênio da piridina, é capaz de aumentar a especificidade dessa molécula para CYP51 (HARGROVE et al., 2013)

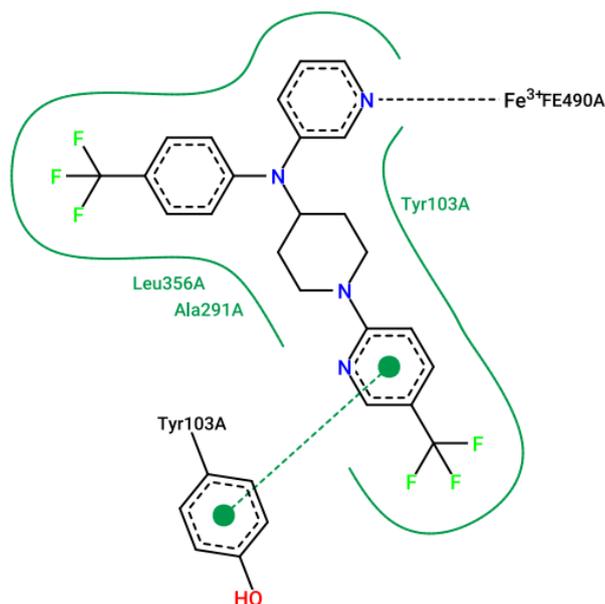


Figura 2: Interação da CYP51 de *T. cruzi* em complexo com o inibidor baseado em piridina. Na qual, as linhas esverdeadas e contínuas representam as interações hidrofóbicas. E as linhas pretas representam as ligações de hidrogênio. Fonte: <https://www.rcsb.org/structure/3ZG3>

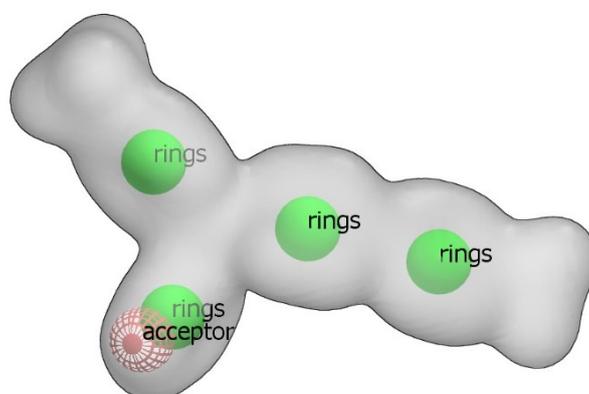


Figura 3: Modelo farmacofórico, construído a partir do programa vROCS. As esferas verdes representam os pontos farmacofóricos das interações hidrofóbicas, em vermelho são os pontos farmacofóricos de aceptores de elétrons e em cinza representa o volume e forma do modelo.

O gráfico bidimensional gerado da curva ROC (Características Operacionais do Receptor, em inglês) apresenta no eixo X a taxa dos resultados falsos positivos, enquanto no

eixo Y são as taxas dos positivos. Assim, foi possível analisar se o modelo determinado era capaz de seleccionar ligantes ativos (actives) em relação aos inativos (decoys). A linha preta tracejada na diagonal representa os resultados aleatórios, logo, quando a curva passa por ela, significa que o modelo está elegendo aleatoriamente entre os compostos ativos e inativos. Dessa forma, quando a curva se apresenta acima da linha tracejada, mostra que o modelo foi competente na escolha dos compostos ativos em comparação com os inativos.

No caso, a curva apresentou-se, majoritariamente, acima da linha tracejada (Fig. 4), concluindo que o modelo 3ZG3 é capaz de escolher ligantes ativos. A área sob a curva (AUC) foi de 0,72, sendo um pouco abaixo do ideal ($\leq 0,8$), isso pode ter ocorrido devido as características dos 20 potentes inibidores (compostos ativos ou azoles) sugeridos pelo artigo Reddy et. al., 2013.

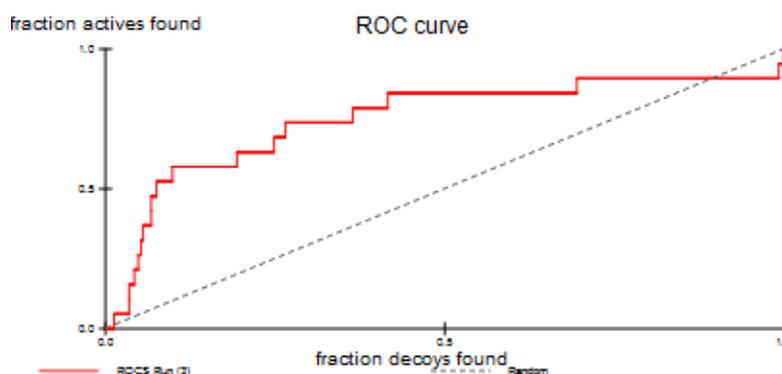


Figura 4: Curva AUC. Gráfico da curva gerada baseando-se na análise dos compostos ativos (actives) e inativos (decoys). Quanto mais afastada da linha pontilhada, menor a probabilidade de ser um modelo aleatório, e quanto maior a área sob a curva (AUC), maior será a probabilidade de ser um modelo similar a moléculas ativas.

5.2. Preparação do banco de dados

Os bancos de dados NuBBE, ZINC, FDA, CL e EXP foram propriamente tratados a partir da filtragem de compostos indesejáveis, o estado de protonação e desprotonação, além dos devidos tautômeros e confôrmeros. E por fim, foi construído os confôrmeros a partir do programa OMEGA, no qual foi obtive-se compostos bioativos com alta rapidez e credibilidade de resultados.

5.3. Triagem e Docking

Os bancos de dados passaram pela triagem virtual por meio do programa ROCS a partir da metodologia baseada em forma e apresentou o ranking das 500 melhores moléculas de cada banco de dados. Esse ranking segue a classificação empregando os scores *Tanimoto combo*, *color force field: Implicit Mills-Dean*, assim, foi possível verificar o quanto cada ligante se encaixa no modelo, tanto no caso de conformação, como em pontos de interação bem definidos.

Em seguida, esses compostos que foram pré-selecionados passaram pelo programa GOLD, o qual avaliou a ancoragem flexível presente entre as proteínas e os ligantes e foi escolhido os 5 melhores resultados de cada banco de dados, sendo o algoritmo de pontuação e ranqueamento CHEMPLP mostrados nas Tabelas 1, 2, 3, 4 e 5.

Tabela 1 – Ranking de moléculas com melhor pontuação CHEMPLP na ancoragem molecular do banco de dados NuBBE

Ranking	Ligante NuBBE	CHEMPLP
1°	558	112.4762
2°	1084	105.7823
3°	1650	105.0405
4°	1191	97.0696
5°	557	97.0274

Tabela 2 – Ranking de moléculas com melhor pontuação CHEMPLP na ancoragem molecular do banco de dados CL

Ranking	Ligante CL	CHEMPLP
1°	401757	105.5214
2°	90993	104.0745
3°	596602	103.1017
4°	588897	102.4908
5°	213385	102.3863

Tabela 3 – Ranking de moléculas com melhor pontuação CHEMPLP na ancoragem molecular do banco de dados EXP

Ranking	Ligante EXP	CHEMPLP
1°	299181	101.0294
2°	131522	100.9184
3°	211933	100.188
4°	270373	99.8352
5°	245715	98.9986

Tabela 4 – Ranking de moléculas com melhor pontuação CHEMPLP na ancoragem molecular do banco de dados ZINC

Ranking	Ligante ZINC	CHEMPLP
1°	_08133202	106.8171
2°	12580862	104.3131
3°	95477833	102.7510
4°	97698932	101.9865
5°	20997881	101.9427

Tabela 5 – Ranking de moléculas com melhor pontuação CHEMPLP na ancoragem molecular do banco de dados FDA

Ranking	Ligante FDA	CHEMPLP
1°	3873936_	115.1487
2°	1895505	109.3886
3°	1481815	109.1912
4°	4175630	109.1512
5°	2016037	107.0918

5.4. Análise de Propriedades Farmacocinéticas *in silico*

A partir do ranking de pontuações obtido anteriormente, as 5 melhores moléculas de cada banco de dados foram submetidas ao web server pkCSM da universidade de Cambridge e analisou-se as propriedades de toxicidade, sendo elas: toxicidade AMES, referente ao potencial mutagênico dos compostos usando bactérias e portanto seu potencial carcinogênico; a hepatotoxicidade, que deve ser levado em conta na produção de drogas, pois lesões ao tecido hepático podem ser agravadas no decorrer do tratamento; a inibição dos canais de potássio pelo hERG, pois esses são os principais causadores na síndrome do QT longo, o qual acarreta em arritmia ventricular fatal; e por fim a máxima dose tolerada, a qual é expressa em

Log(mg/kg/dia) e valores iguais ou menores que 0,477 são considerados baixos, ou seja, dose que causará pequena toxicidade.

Os resultados das moléculas do banco de dados NuBBE em comparação com a piridina estão apresentados na tabela 6 abaixo. É possível perceber com a interpretação da tabela que o melhor resultado foi a NuBBE 1191, porém ela está muito acima da dose máxima tolerada.

Tabela 6 – Resultados pkCSM bando de dados NuBBE e comparação com a piridina

Código NuBBE	AMES toxicidade	Hepatotoxicidade	hERG I inibidor	hERG II inibidor	Dose Máxima Tolerável (humano) Log
PYRIDINE	Sim	Sim	Não	Sim	-589
NUBBE 558	Não	Não	Não	Sim	478
NUBBE 1084	Não	Sim	Não	Não	79
NUBBE 1650	Não	Sim	Não	Não	0.18
NUBBE 557	Não	Não	Não	Sim	466
NUBBE 1191	Não	Não	Não	Não	44

Os resultados obtidos das moléculas do banco de dados CL em comparação com a piridina foram dispostos na tabela 7 a seguir. A partir da análise dos dados podemos dizer que todas as moléculas apresentam o caráter de hepatotoxicidade e inibem os canais de potássio no caso da hERG II. O resultado que não apresenta capacidade mutagênica e dose máxima tolerável é a CL 213385 e CL 90993.

Tabela 7 – Resultados pkCSM bando de dados CL e comparação com a piridina

Código CL	AMES toxicidade	Hepatotoxicidade	hERG I inibidor	hERG II inibidor	Dose Máxima Tolerável (humano) Log
PYRIDINE	Sim	Sim	Não	Sim	-589
CL 596602	Sim	Sim	Não	Sim	411
CL 588897	Sim	Sim	Não	Sim	-215
CL 401757	Não	Sim	Não	Sim	573
CL 213385	Não	Sim	Não	Sim	-0.43
CL 90993	Não	Sim	Não	Sim	-268

Os resultados obtidos do banco de dados EXP em comparação com a piridina são observados na tabela 8. Nesse caso, é possível observar que nenhum composto apresenta potencial carcinogênico e todos são inibidores dos canais de potássio para o hERG II, além disso as doses são todas acima do tolerável, sendo aquela que apresenta menor dosagem a molécula EXP 245715.

Tabela 8 - Resultados pkCSM bando de dados EXP e comparação com a piridina

Código EXP	AMES toxicidade	Hepatotoxicidade	hERG I inibidor	hERG II inibidor	Dose Máxima Tolerável (humano) Log
PYRIDINE	Sim	Sim	Não	Sim	-589
EXP 270373	Não	Não	Não	Sim	276
EXP 131522	Não	Não	Não	Sim	428
EXP 211933	Não	Sim	Não	Sim	157
EXP 299181	Não	Não	Não	Sim	482
EXP 245715	Não	Não	Não	Sim	211

Os resultados do banco de dados ZINC em comparação com a piridina podem ser vistos na tabela 9. De acordo com análise dos dados, nenhuma molécula possui caráter carcinogênico, porém o melhor resultado seria a molécula ZINC 08133202, mas essa apresenta uma dose muito elevada acima do tolerável.

Tabela 9 - Resultados pkCSM bando de dados ZINC e comparação com a piridina

Código ZINC	AMES toxicidade	Hepatotoxicidade	hERG I inibidor	hERG II inibidor	Dose Máxima Tolerável (humano) Log
PYRIDINE	Sim	Sim	Não	Sim	-589
ZINC 95477833	Não	Não	Não	Sim	681
ZINC 12580862	Não	Sim	Não	Sim	-4
ZINC 97698932	Não	Sim	Não	Não	437
ZINC 20997881	Não	Não	Não	Sim	17
ZINC 08133202	Não	Não	Não	Não	268

Por fim, os resultados obtidos do banco de dados FDA em comparação com a piridina estão apresentados na tabela 10. O melhor resultado obtido, ainda que apresente hepatotoxicidade, foi a molécula FDA 1481815. Porém essa também possui dose muito acima do tolerável.

Tabela 10 - Resultados pkCSM bando de dados FDA e comparação com a piridina

Código FDA	AMES toxicidade	Hepatotoxicidade	hERG I inibidor	hERG II inibidor	Dose Máxima Tolerável (humano) Log
PYRIDINE	Sim	Sim	Não	Sim	-589
FDA 2016037	Sim	Não	Sim	Sim	798
FDA 4175630	Sim	Sim	Sim	Sim	-209
FDA 1895505	Sim	Não	Não	Sim	424
FDA 1481815	Não	Sim	Não	Não	571
FDA 3873936	Não	Sim	Não	Sim	0.6

5.5. Geração de diagramas de interação 2D proteína-ligante

O programa LigPlot+ foi usado para gerar as imagens que representam as interações 2D proteína-ligante das melhores moléculas de cada banco de dados, a partir do ranking do Docking. Nas imagens referentes ao LigPlot+, as formas em arcos vermelhos representam resíduos de aminoácidos envolvidos em interações hidrofóbicas, as linhas tracejadas em verde representam ligações de hidrogênio, a cor marrom representa aminoácidos e a cor roxa

representa o ligante. Ademais, para quesito representativo, a representação gráfica em 3D dos mesmos ligantes construídos por meio do Software Discovery Studio Visualizer (BioVida, 2017), no qual a estrutura em conformação circular ao centro representa cada ligante em questão.

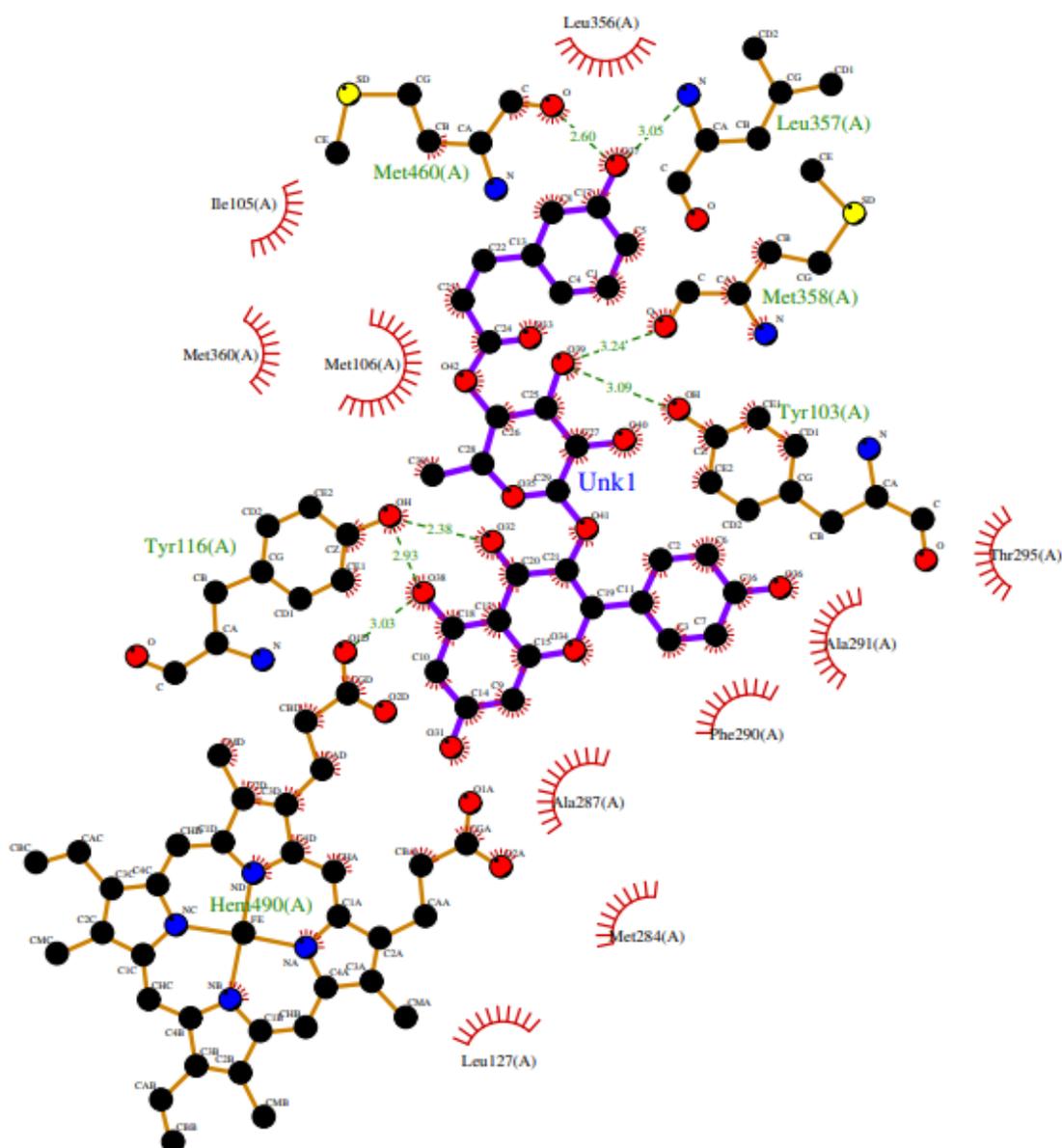


Figura 5: Representação em 2D do ligante NUBBE 558. As formas em arcos vermelhos representam resíduos de aminoácidos envolvidos em interações hidrofóbicas, as linhas tracejadas em verde representam ligações de hidrogênio, a cor marrom representa aminoácidos e a cor roxa representa o ligante

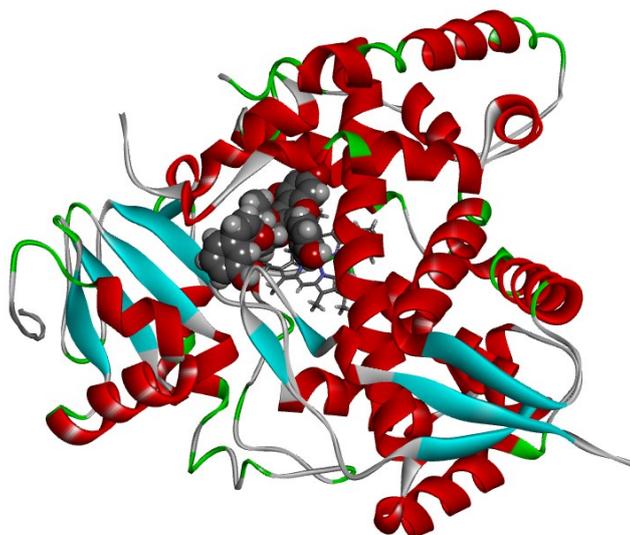


Figura 6: Visualização do ligante NUBBE 558 no Discovery Studio Visualizer.

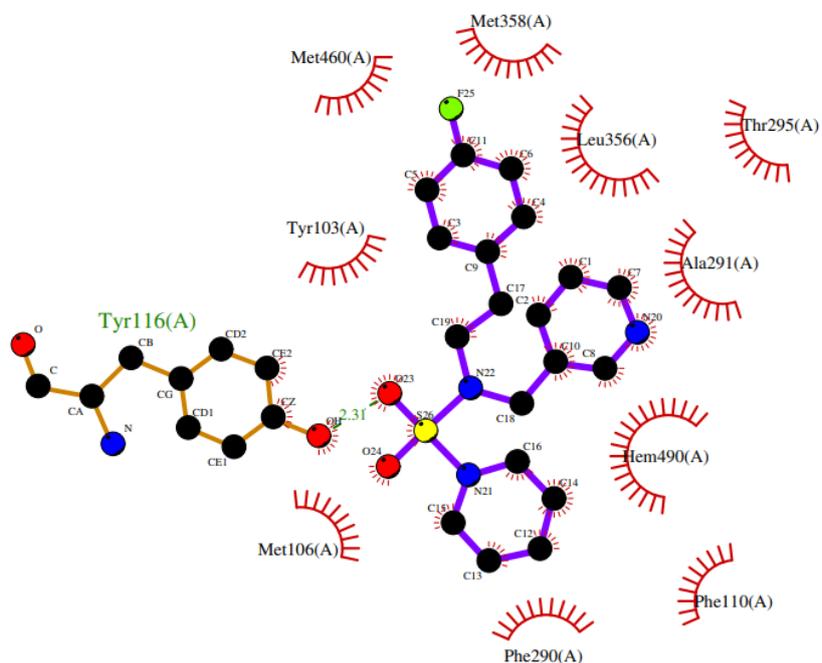


Figura 7: Representação em 2D do ligante CL 401757. As formas em arcos vermelhos representam resíduos de aminoácidos envolvidos em interações hidrofóbicas, as linhas tracejadas em verde representam ligações de hidrogênio, a cor marrom representa aminoácidos e a cor roxa representa o ligante

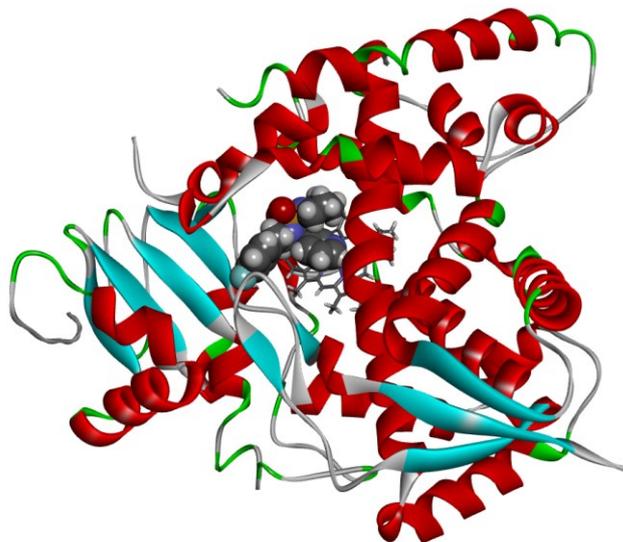


Figura 8: Visualização do ligante CL 401757 no Discovery Studio Visualizer.

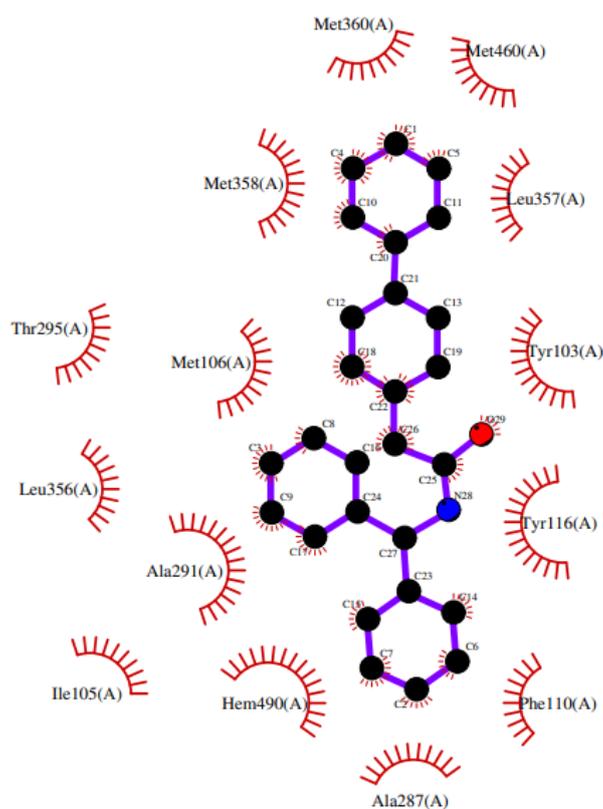


Figura 9: Representação 2D do ligante EXP 299181. As formas em arcos vermelhos representam resíduos de aminoácidos envolvidos em interações hidrofóbicas, as linhas tracejadas em verde representam ligações de hidrogênio, a cor marrom representa aminoácidos e a cor roxa representa o ligante

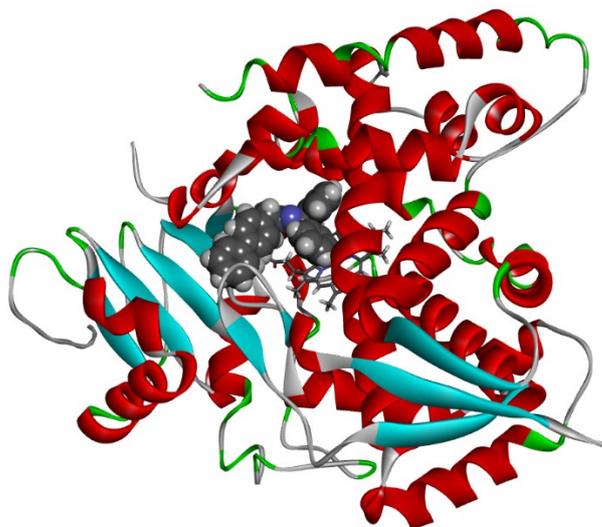


Figura 10: Visualização do ligante EXP 299181 no Discovery Studio Visualizer.

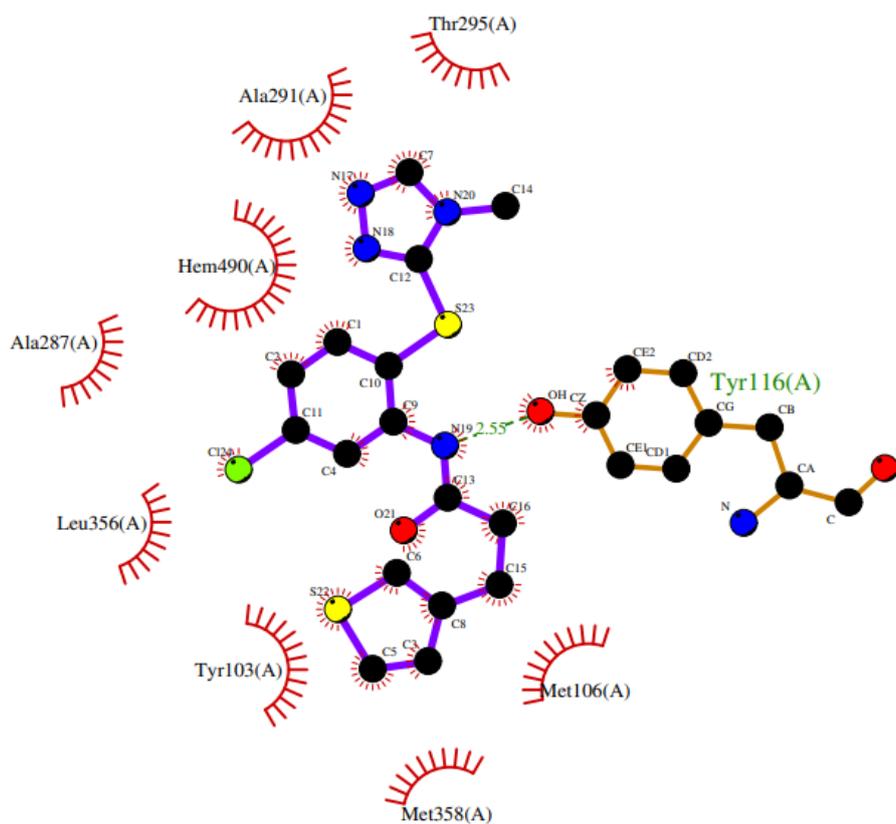


Figura 11: Representação 2D do ligante ZINC 08133202. As formas em arcos vermelhos representam resíduos de aminoácidos envolvidos em interações hidrofóbicas, as linhas tracejadas em verde representam ligações de hidrogênio, a cor marrom representa aminoácidos e a cor roxa representa o ligante

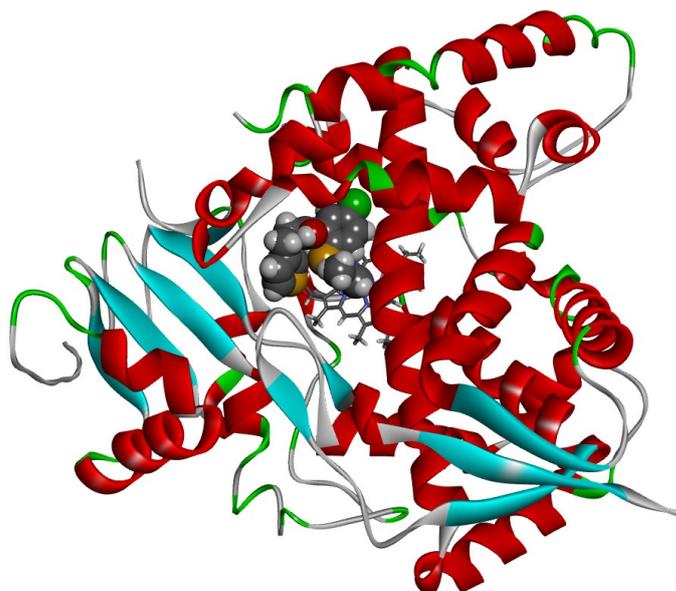


Figura 12: Visualização do ligante ZINC 08133202 no Discovery Studio Visualizer.

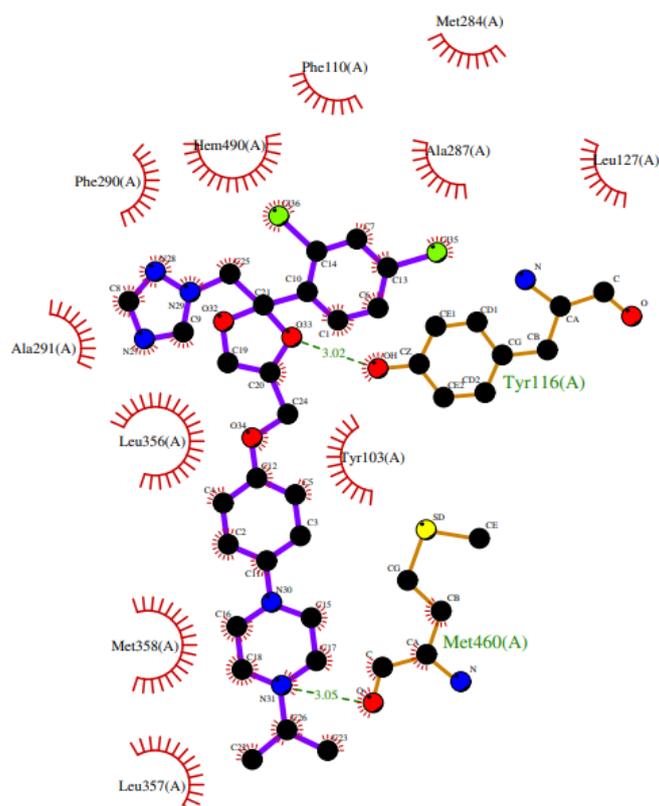


Figura 13: Representação 2D do ligante FDA 3873936. As formas em arcos vermelhos representam resíduos de aminoácidos envolvidos em interações hidrofóbicas, as linhas tracejadas em verde representam ligações de hidrogênio, a cor marrom representa aminoácidos e a cor roxa representa o ligante

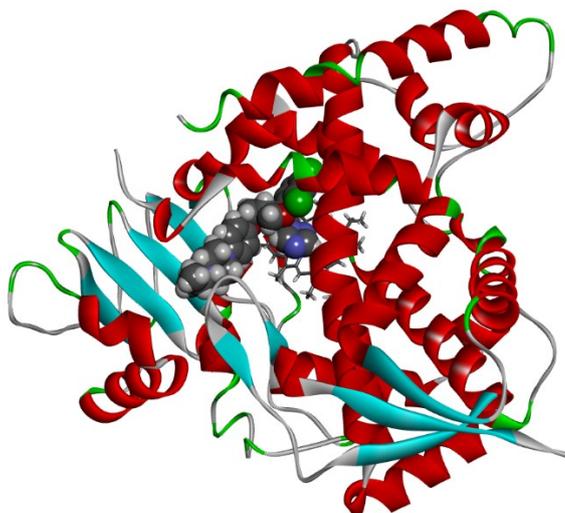


Figura 14: Visualização do ligante FDA 3873936 no Discovery Studio Visualizer

6. DISCUSSÃO

Entre os ligantes que se destacaram temos o NuBBE 558 conhecido cientificamente como *Vochysiaceae Qualea grandiflora* e popularmente como pau-terra ou pau-terra-de-folha-larga. A árvore é caducifólia, característica de perda total de suas folhas durante os meses mais frios do ano, podendo chegar até 15 metros de altura. Está presente no Suriname, Peru, Bolívia, Paraguai e no Brasil nos estados de Rondônia, Acre, Amazonas, Pará, Tocantins, Maranhão, Ceará, Bahia, Minas Gerais, São Paulo e Paraná. É uma das espécies mais conhecidas do Cerrado, considerada como uma das responsáveis pelas formações savânicas desse bioma (PEREIRA, s.d.).

Atualmente é possível encontrar cerca de 50,4% dos medicamentos prescritos originários de plantas e derivados naturais, por possuírem inúmeras possibilidades de substâncias biologicamente ativas com características farmacológicas nas áreas antitumorais, anti-inflamatórias, antioxidantes, antibióticas e antiparasitárias (ARANTES, 2017). Ensaios com o

óleo essencial extraído da *Qualea grandiflora* como atividade antileishmania foram realizados e concluídos que há inibição parasitária, com resultados promissores (ROCHA, 2014). Apesar de que para tal a concentração deveria ser relativamente alta, o que condiz com os resultados encontrados na tabela 6 indicando a dose elevada desse composto. Além disso, segundo ROCHA (2014) o óleo essencial da *Q. grandiflora* apresentou ser menos tóxicos a nossas células e mais tóxico ao parasita. Assim como a Doença de Chagas, a Leishmaniose também é conhecida como uma doença negligenciada e transmitida por um parasita, então é provável que resultados parecidos sejam encontrados. Ademais, de acordo com sua farmacocinética não apresenta potencial mutagênico e hepatotoxicidade. Argumento que reforça que esse composto natural possui grande capacidade para o combate da Doença de Chagas.

O segundo ligante de destaque foi o FDA 3873936, conhecido como zazole, presente no medicamento terconazol, usado para tratamento de infecções fúngicas vaginais. Esse ligante está presente na família dos azóis, os quais são capazes de atuar na CYP51, como já abordado anteriormente. De acordo com sua farmacocinética vista na tabela 10, esse ligante apresenta boa dose tolerável, porém apresentou resultado positivo para hepatotoxicidade. Apesar de possuir boas características para um possível desenvolvimento de fármaco, ainda não há estudos relacionando esse ligante com o *Trypanosoma cruzi*.

Já no caso dos ligantes referentes ao banco de dados ZINC, CL e EXP não há indícios de nenhum estudo no caso do ZINC e os dois últimos, por serem banco de dados particulares, o acesso é restrito. Porém, no caso do EXP 299181 e ZINC 08133202, aparentam ser promissores visto que não são causadores mutagênicos, não apresentam hepatotoxicidade ou inibição, de acordo com as tabelas 8 e 9 respectivamente, apesar da característica de alta dosagem. E, por

fim, o CL 401757 que além de apresentar alta dosagem, foi positivo para hepatotoxicidade e inibidor de hERG II.

7. CONCLUSÃO

Conclui-se que foi possível a construção do modelo farmacofórico em complexo com a proteína CYP51 de *T. cruzi*, observar as interações com os ligantes retirados dos bancos de dados e analisar suas propriedades farmacocinéticas dos 5 melhores resultados de cada banco em questão. Obteve-se 2 resultados que apresentaram melhores interações e podem ser possíveis alvos promissores para o desenvolvimento de novas drogas. Um deles incluindo um composto natural do banco de dados NuBBE, reforçando a indústria de produtos derivados de compostos naturais e engrandecendo o bioma do cerrado brasileiro.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARANTES, J.T. O potencial farmacológico dos produtos naturais. Agência FAPESP. 17 de novembro de 2017. Disponível em: < <https://agencia.fapesp.br/o-potencial-farmacologico-dos-produtos-naturais/26662/> >. Acesso em: 02 de agosto de 2022.

AZEVEDO, W. F. Jr; SOARES, M. B. Selection of targets for drug development Against protozoan parasites. Current Drug Targets 2009.

BERMAN, H. M. (2000). The Protein Data Bank. Nucleic Acids Research, 28(1), 235–242. doi:10.1093/nar/28.1.235

BROWN, G. D. The biosynthesis of steroids and triterpenoids. Natural Product Reports. 1998.
BURLEIGH, B. A.; ANDREWS, N. W. Signaling and host cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. Current Opinion in Microbiology, [S. l.], v. 1, n. 4, p. 461–465, 1998. DOI: 10.1016/S1369-5274(98)80066-0.

CANÇADO, J. R. Long term evaluation of etiological treatment of Chagas disease with benznidazole. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*, [S. l.], v. 44, n. 1, p. 29–37, 2002. DOI: 10.1590/S0036-46652002000100006.

CASTRO, J. A.; MONTALTO, M.; BARTEL, L. C. Human & Experimental Toxicology Toxic side effects of drugs used to treat Chagas' disease (American trypanosomiasis). [S. l.], 2006. DOI: 10.1191/0960327106het653oa.

COURA, J. R.; CASTRO, S. L. A. Critical Review on Chagas Disease Chemotherapy. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* [online]. 2002, v. 97, n. 1. Acesso em: 24 março 2022, pp. 3-24. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S0074-02762002000100001>>

FERREIRA, A. M. et al. Reações adversas ao benzonidazol no tratamento da Doença de Chagas: revisão sistemática de ensaios clínicos randomizados e controlados Adverse reactions to benznidazole in the treatment of controlled trials. [S. l.], v. 27, n. 3, p. 354–362, [s.d.]. DOI: 10.1590/1414-462X201900030456.

FRANÇA, R. R. F.; CARVALHO, A. S.; BRANCO, F. S. C.; PINTO, A. C.; BOECHAT, N. Inibidores potentes da enzima esterol 14 α -desmetilase contra *Trypanosoma cruzi*. *Revista Virtual em Química*, 2014.

HARGROVE, T. Y. et al. Complexes of *Trypanosoma cruzi* Sterol 14 α -Demethylase (CYP51) with Two Pyridine-based Drug Candidates for Chagas Disease. [S. l.], v. 288, n. 44, p. 31602–31615, 2013. DOI: 10.1074/jbc.M113.497990.

HAWKINS, P. C. D., SKILLMAN, A. G., WARREN, G. L., ELLINGSON, B. A., & STAHL, M. T. (2010). Conformer Generation with OMEGA: Algorithm and Validation Using High Quality Structures from the Protein Databank and Cambridge Structural Database. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 50(4), 572–584. doi:10.1021/ci100031x

HAWKINS, P. C. D.; SKILLMAN, A. G.; NICHOLLS, A. Comparison of shape-matching and docking as virtual screening tools. *Journal of Medicinal Chemistry*, [S. l.], v. 50, n. 1, p. 74–82, 2007. DOI: 10.1021/jm0603365.

IRWIN, J. J.; STERLING, T.; MYSINGER, M. M.; BOLSTAD, E. S.; COLEMAN, R. G. ZINC: A Free Tool to Discover Chemistry for Biology. [S. l.], 2012. DOI: 10.1021/ci3001277. JR, A. R.; RASSI, A.; MARIN-NETO, J. A. Chagas disease. *The Lancet*, [S. l.], v. 375, n. 9723, p. 1388–1402, 2010. Elsevier BV. DOI: 10.1016/S0140-6736(10)60061-X.

LASKOWSKI, R. A., SWINDELLS M. B. *Journal of Chemical Information And Modeling*, 2011 51 (10), 2778-2786. DOI: 10.1021/ci200227u

MACK, J.; STILLMAN, M. J. Em *The Porphyrin Handbook*, Kadish, K. M., Smith, K. M., Guillard, S. R., eds.; Academic Press: Amsterdam, cap 2013, 2003. DOI: 10.1016/B978-0-08-092390-1.50008-4.

MYSINGER, M. M.; CARCHIA, M.; IRWIN, J. J.; SHOICHET, B. K. Directory of useful decoys, enhanced (DUD-E): Better ligands and decoys for better benchmarking. *Journal of Medicinal Chemistry*, [S. l.], v. 55, n. 14, p. 6582–6594, 2012. DOI: 10.1021/jm300687e.

OOMS F. Molecular modeling and computer aided drug design. Examples of their applications in medicinal chemistry. *Curr Med Chem*. 2000 Feb;7(2):141-58. doi: 10.2174/0929867003375317.

PEARSON, R. Doença de Chagas. Manual MSD, versão para profissionais da saúde 2019. Disponível em: <<https://www.msmanuals.com/pt-br/profissional/doen%C3%A7as-infecciosas/protozo%C3%A1rios-extraintestinais/doen%C3%A7a-de-chagas/>>. Acesso em 17 de mar. de 2021.

PEREIRA, B. A. S. *Qualea grandiflora* Mart. *Arvores do Bioma Cerrado*. [s.d]. Disponível em: <<https://www.arvoresdobiomacerrado.com.br/site/2017/10/02/qualea-grandiflora-mart/>> Acesso em: 02 de agosto de 2022.

PIRES, D. E. V.; BLUNDELL, T. L.; ASCHER, D. B. pkCSM: Predicting smallmolecule pharmacokinetic and toxicity properties using graph-based signatures. *Journal of Medicinal Chemistry*, [S. l.], v. 58, n. 9, p. 4066–4072, 2015. DOI: 10.1021/acs.jmedchem.5b00104.

REDDY, K. K.; SINGH, S. K.; TRIPATHI, S. K.; SELVARAJ, C.; SURYANARAYANAN, V. Shape and pharmacophore-based virtual screening to identify potential cytochrome P450 sterol 14 α -demethylase inhibitors. *Journal of Receptors and Signal Transduction*, [S. l.], v. 33, n. 4, p. 234–243, 2013. DOI: 10.3109/10799893.2013.789912.

ROCHA, R. R. Estudo da composição química dos óleos essenciais e as atividades antioxidante, antimicrobiana e antiprotozoária do óleo essencial e de extratos etanólicos de folhas de *qualea grandiflora* e *qualea multiflora* mart. 2014. 122 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Exatas e da Terra) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2014. DOI: 10.14393/ufu.di.2014.441.

SHANMUGAM, G., & JEON, J. (2017). Computer-Aided Drug Discovery in Plant Pathology. *The Plant Pathology Journal*, 33(6), 529–542. DOI: 10.5423/ppj.rw.04.2017.0084

SUETH-SANTIAGO, V., FRANKLIM, T. N.; LOPES, N. D.; LIMA, M. E. F. CYP51: Uma boa ideia?. *Revisão Virtual Quim.*, 539-575, 7 (2), 2015.

TYLER, K. M., & ENGMAN, D. M. (2001). The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited. *International Journal for Parasitology*, 31(5-6), 472–481. DOI: 10.1016/s0020-7519(01)00153-9

URBINA, J. A. Ergosterol biosynthesis and drug development for Chagas disease. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 104, 311, 2009.

VAN ZANTEN, A. Postface De la ségrégation aux inégalités: La réduction des opportunités. *Formation Emploi, Formation emploi*, vol. 120, no. 4, 2012, pp. 127-134. doi.org/10.4000/formationemploi.3853.

VIÑAS, P. A. Chagas disease: a new worldwide challenge. [*S. l.*], n. June, p. 6–7, 2010. DOI: 10.1016/j.actatropica.2009.11.003.

WERMUTH, C. G.; GANELLIN, C. R.; LINDBERG, P.; MITSCHER, L. A. Chapter 36. Glossary of Terms Used in Medicinal Chemistry (IUPAC Recommendations 1997. *Annual Reports in Medicinal Chemistry*, [*S. l.*], v. 33, n. C, p. 385–395, 1998. DOI: 10.1016/S0065-7743(08)61101-X.