

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
CURSO DE BIOTECNOLOGIA

Prospecção virtual e dinâmica molecular de potenciais ligantes para a inibição da proteína
Tripanotiona Redutase de *Leishmania infantum*

Yasmim Nunes Mesquita

Prof. Dr. Nilson Nicolau Junior

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

Uberlândia – MG
Setembro de 2025

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
CURSO DE BIOTECNOLOGIA

Prospecção virtual e dinâmica molecular de potenciais ligantes para a inibição da proteína
Tripanotiona Redutase de *Leishmania infantum*

Yasmim Nunes Mesquita

Prof. Dr. Nilson Nicolau Junior
Instituto de Biotecnologia

Homologado pela coordenação do Curso
de Biotecnologia em __/__/__

Uberlândia – MG
Setembro de 2025

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
CURSO DE BIOTECNOLOGIA

Prospecção virtual e dinâmica molecular de potenciais ligantes para a inibição da proteína
Tripanotiona Redutase de *Leishmania infantum*

Yasmim Nunes Mesquita

Aprovada pela Banca Examinadora em: 22 /09/2025 Nota: 100

Banca examinadora:

Prof. Dr. Nilson Nicolau Junior – IBTEC
Orientador

Profa. Dra. Renata Santos Rodrigues – IBTEC
Membro

M.e. José Augusto Leoncio Gomide – IBTEC
Membro

Uberlândia, 22 de setembro de 2025

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, Maria Lucinete e Wéldion, por todo apoio, amor e cuidado durante toda a minha vida, sempre estiveram ao meu lado sempre que precisei. Aos meus irmão, Marcos e Wéldion Júnior, por toda força e carinho que me deram. Sem vocês, nada disso seria possível.

Aos amigos que conquistei durante minha vida e na graduação, agradeço por estarem ao meu lado durante toda minha trajetória, obrigada pela parceria, carinho e amizade.

Ao meu orientador Prof. Dr. Nilson, agradeço a paciência, o apoio, pela confiança em me aceitar como orientanda e obrigada pelas orientações que me ajudaram a me desenvolver.

Por fim, agradeço a UFU, IBTEC, FAPEMIG, CAPES E CNPq por terem agregado valor ao meu desenvolvimento pessoal e profissional.

RESUMO

A Leishmaniose é uma doença tropical negligenciada, causada por protozoários do gênero *Leishmania spp*, tem na leishmaniose visceral (LV) a forma mais grave, sendo esta causada por *Leishmania infantum* (LI). A enzima Tripanotiona redutase (TR) é um alvo molecular promissor para inibidores devido ao seu papel na homeostase redox do parasita e sua ausência no hospedeiro humano. A TR torna possível a conversão da tripanotiona ditiol utilizando o co-substrato NADPH, sendo essencial no metabolismo antioxidante do patógeno. Este projeto utilizou ferramentas de *Drug Design* para identificar potenciais inibidores da TR em LI. O modelo estrutural da TR, inicialmente, foi obtido do banco de dados Protein Data Bank (PDB id: 6ER5). Outras estruturas de inibidores potenciais também foram identificadas no PDB. Modelos baseados em forma foram gerados a partir da interface de interação entre a enzima e os ligantes, utilizando os programas vROCs. Os 500 compostos com melhor score de prospecção de cada biblioteca (incluindo NuBBE, FDA, ZINC12, CL e EXP) foram submetidos ao *docking* molecular com a TR utilizando o programa GOLD. As propriedades farmacocinéticas (ADME-T) dos 10 melhores compostos foram preditas pelo servidor pkCSM. Dentre as 10 melhores moléculas, 2 seguiram para a etapa da dinâmica molecular (DM), um método que consiste em avaliar as interações proteína-ligante ao longo do tempo e analisar possíveis conformações por meio dos seguintes métodos: Desvio Quadrático Médio (RMSD), Flutuação Quadrática Média (RMSF), número de ligações de hidrogênio e análise da energia de ligação. Entre os ligantes de maior destaque, o NuBBE 1208 e o NuBBE 877 apresentaram os maiores potenciais inibitórios contra a TR de LI. Os resultados mostram que a abordagem de *Drug Design* pode identificar compostos promissores para inibição de TR, ressaltando o potencial do NuBBE 1208 e do NuBBE 877. Além disso, sugerem novos caminhos para o desenvolvimento de terapias contra a leishmaniose visceral, o que pode apresentar um impacto significativo na produção de novos fármacos e ao combate a essa doença.

Palavras-chave: *Drug Design*; Leishmaniose Visceral; *Docking Molecular*; Triagem virtual; Bioinformática.

ABSTRACT

Leishmaniasis is a neglected tropical disease, caused by protozoa of the genus *Leishmania spp*, has visceral leishmaniasis (VL) as its most severe form, caused by *Leishmania infantum* (LI). The enzyme trypanothione reductase (TR) is a promising molecular target for inhibitors due to its role in the redox homeostasis of the parasite and its absence in the human host. TR enables the conversion of tripanothione dithiol using the co-substrate NADPH, which is essential for the pathogen's antioxidant metabolism. This project used drug design tools to identify potential TR inhibitors in LI. The structural model of TR was initially obtained from the Protein Data Bank (PDB id: 6ER5). Other structures of potential inhibitors were also identified in the PDB. Shape-based models were generated from the interaction interface between the enzyme and the ligands using vROCs programs. The 500 compounds with the best prospecting score from each library (including NuBBE, FDA, ZINC12, CL, and EXP) were subjected to molecular docking with TR using the GOLD program. The pharmacokinetic properties (ADME-T) of the 10 best compounds were predicted by the pkCSM server. Among the 10 best molecules, 2 proceeded to the molecular dynamics (MD) stage, a method that consists of evaluating protein-ligand interactions over time and analyzing possible conformations using the following methods: Root Mean Square Deviation (RMSD), Root Mean Square Fluctuation (RMSF), number of hydrogen bonds, and bond energy analysis. Among the most prominent ligands, NuBBE 1208 and NuBBE 877 showed the highest inhibitory potential against LI TR. The results show that the Drug Design approach can identify promising compounds for TR inhibition, highlighting the potential of NuBBE 1208 and NuBBE 877. In addition, they suggest new avenues for the development of therapies against visceral leishmaniasis, which may have a significant impact on the production of new drugs and the fight against this disease.

Keywords: Drug Design, Visceral Leishmaniasis, Molecular Docking, Virtual Screening, Bioinformatics.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ADMET	Absorção, Distribuição, Metabolismo, Excreção e Toxicidade
APO	Proteína sem ligante
Arg	Arginina
Asn	Asparagina
BVN	2-(dietilamino)etil 4-((3-(4-nitrofenil)-3-oxopropil)amino)benzoato
CL	<i>Core Library</i>
DM	Dinâmica Molecular
EXP	<i>Express Pick</i>
FDA	<i>Federal Drug Administration</i>
Gly	Glicina
Ile	Isoleucina
Leu	Leucina
LI	<i>Leishmania infantum</i>
LV	Leishmania Visceral
MMPBSA	<i>Molecular Mechanics Poisson – Boltzmann Surface Area</i>
NUBBE	Núcleo de Bioensaios, Biossíntese e Ecofisiologia de Produtos Naturais
PDB	Protein Data Bank
Phe	Fenilalanina
pkCSM	Programa que avalia o ADMET de uma molécula
RMSD	Desvio Quadrático Médio
RMSF	Flutuação Quadrática Média
SUS	Sistema Único de Saúde
TR	<i>Tripanotiona Redutase</i>
Tyr	Tirosina
Val	Valina
VMD	<i>Visual Molecular Dynamics</i>
vROCS	Programa baseado no método de comparação de forma

SUMÁRIO

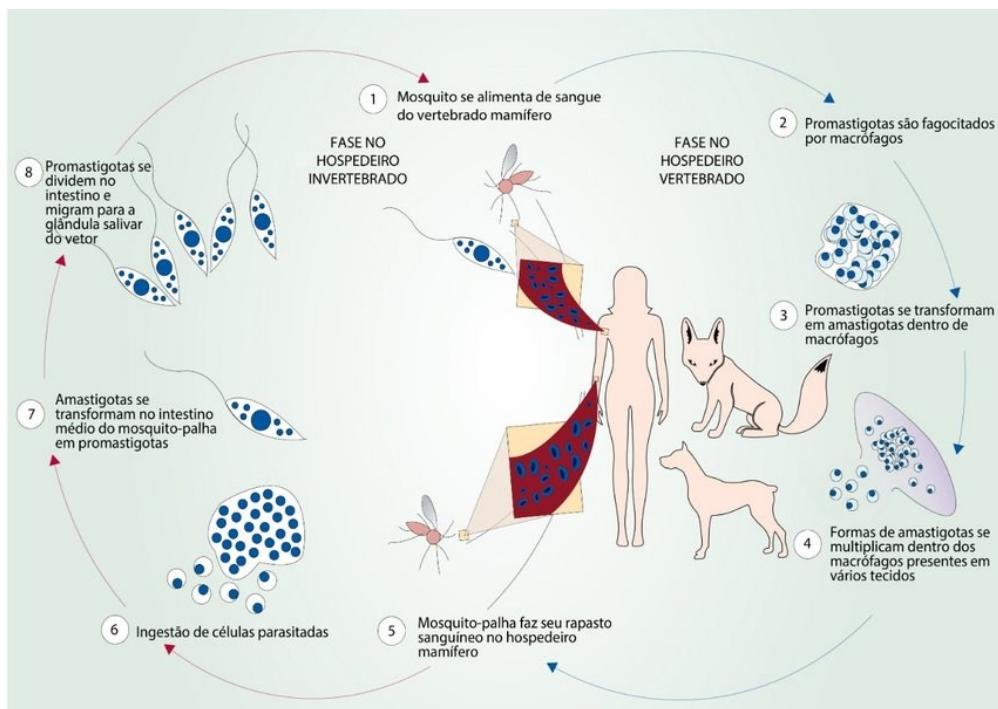
1. INTRODUÇÃO.....	09
2. JUSTIFICATIVA.....	11
3. OBJETIVOS.....	12
3.1. Objetivo Geral.....	12
3.2. Objetivos Específicos.....	12
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	12
4.1. Geração do modelo baseado em forma do ligante.....	12
4.2. Preparo do bancos de dados.....	13
4.3. Triagem virtual e docking.....	15
4.4. Análise de propriedades farmacocinéticas <i>in silico</i>	15
4.5. Geração de diagramas de interação 2D proteína-ligante.....	15
4.6. Dinâmica molecular DM	15
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	16
5.1. Geração do modelo baseado em forma do ligante.....	16
5.2. Preparo do bancos de dados.....	16
5.3. Triagem virtual e docking.....	17
5.4. Análise de propriedades farmacocinéticas <i>in silico</i>	18
5.5. Geração de diagramas de interação 2D proteína-ligante.....	19
5.6. Dinâmica molecular DM	20
5.6.1. Análise do RMSD.....	20
5.6.2. Análise da RMSF.....	21
5.6.3. Análise das ligações de hidrogênio	23
5.6.4. Análise das energias de ligação	24
6. CONCLUSÃO.....	25
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	26
ANEXO A – TABELAS COMPLEMENTARES DO PKCSM	28

1. INTRODUÇÃO

A leishmaniose é uma doença zoonótica causada por protozoários do gênero *Leishmania*, da família *Trypanosomatidae*. A transmissão para humanos ocorre através da picada de fêmeas de insetos da subfamília *Phlebotominae*, popularmente conhecidos no Brasil como “asa branca”, “mosquito-palha”, “tatuquira”, “cangalhinha” ou “birigui”, dentre outros nomes (Brasil, 2024).

Esses protozoários existem em duas formas: a flagelada (promastigota) e a não flagelada (amastigota). Na Figura 1 é possível observar o ciclo infeccioso, ele começa quando um inseto flebotomíneo infectado se alimenta do sangue do hospedeiro, injetando nele promastigotas metacíclicos. No interior do hospedeiro, esses parasitas invadem células mononucleares fagocíticas, como macrófagos, onde se transformam em amastigotas. Dentro das células, os amastigotas se multiplicam e podem invadir outros tecidos. As células infectadas podem eventualmente romper-se, liberando amastigotas que podem ser ingeridas por outros insetos vetores durante a alimentação. No intestino médio do inseto vetor, os amastigotas transformam-se novamente em promastigotas, multiplicando-se e migrando para a probóscide do inseto, prontos para iniciar um novo ciclo de infecção (Moreira *et al.*, 2020).

Figura 1 – Ciclo biológico e de transmissão de *Leishmania*.



Fonte: Moreira *et al.*, 2020.

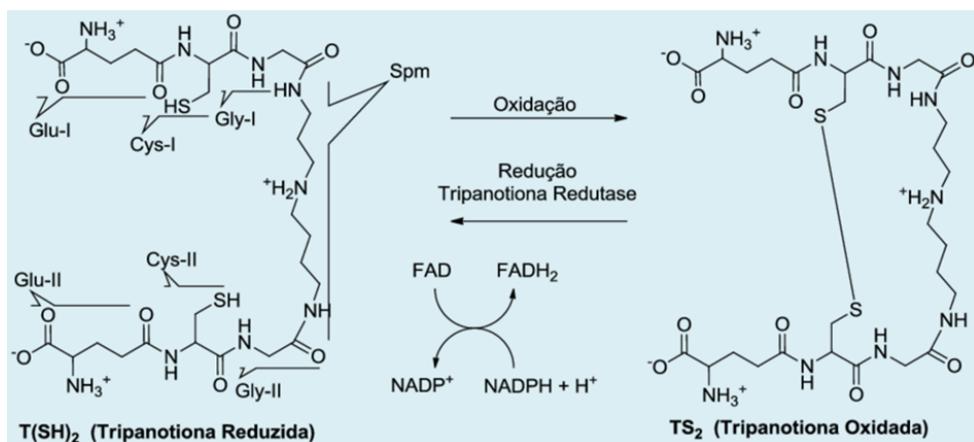
A Leishmaniose, causada por *Leishmania infantum* (LI), tem na leishmaniose visceral (LV) também conhecida como calazar, a forma mais grave devido à febre de longa duração, perda de peso, fraqueza, redução de força muscular, anemia, a não especificidade dos sintomas, além da sua capacidade imunossupressora e de afetar órgãos viscerais como baço e fígado, assim, podendo levar ao óbito em 90% dos casos se não tratada. No mundo, aproximadamente 100 mil casos de LV ocorrem a cada ano (Brasil, 2024). Existem outras formas clínicas da doença, como a leishmaniose cutânea e leishmaniose mucocutânea.

Um dos medicamentos que são usados para tratamento de LV é oferecido pelo Sistema Único de Saúde (SUS), a Anfotericina B Lipossomal (Brasil, 2024). Existem outros medicamentos para o combate da leishmaniose como, a paromomicina, a pentamidina, os antimoniais pentavalentes. A LV possui procedimento desafiador, apresentando longa duração no tratamento e com diversos efeitos colaterais como, arritmias cardíacas, nefrotoxicidade, problemas gastrointestinais, hepatotoxicidade (Santiago; Rocha Pita; Guimarães, 2021).

Desta forma, novas pesquisas são necessárias para o desenvolvimento de fármacos eficientes e seguros contra a leishmaniose. A bioinformática vem se destacado cada vez mais nos últimos anos como uma ferramenta essencial no desenvolvimento de novos fármacos. Ela acelera o processo e reduz os custos, facilita na identificação de ligantes mais promissores em diversos bancos de dados *in silico* (Shanmugam; Jeon, 2017).

Para o desenvolvimento de novos fármacos para o combate da LV, observou-se um alvo promissor, a enzima Tripanotiona Redutase (TR) de LI, ela atua na manutenção do balanço redox intracelular, reduzindo a Tripanotiona, um composto que contém grupos sulfidrila (Pita; Pascutti, 2011). A TR cria um meio biológico que é favorável para LI através da mediação da redução dependente de NADPH da Tripanotiona oxidada, demonstrada na Figura 2, repondo assim a capacidade antioxidante do protozoário e desintoxicando as espécies reativas de nitrogênio e oxigênio, que são impostas pelo sistema imune do hospedeiro, podendo ser prejudiciais ao parasita. Além disso, a TR é um alvo molecular promissor para inibidores devido a sua ausência no hospedeiro humano (Battista *et al.*, 2020).

Figura 2 – Esquema do processo de oxidação e redução da TR



Fonte: Pita; Pascutti, 2011.

O alvo promissor para a inibição da TR de LI correspondente à estrutura cristalina do complexo entre a 2-(dietilamino)etil 4-((3-(4-nitrofenil)-3-oxopropil)amino)benzoato (BVN) (Figura 2) e a TR *L. infantum* (PDB: 6ER5) (Figura 3) (Turcano *et al.*, 2018). O composto BVN apresentou melhores resultados nos experimentos in vitro para a inibição da TR, destacando-o como o melhor ligante para a busca por novos princípios ativos que possam ter melhor eficácia, maior segurança e biodisponibilidade oral.

Técnicas computacionais revolucionaram o processo em auxiliar nas descobertas de novos fármacos para o desenvolvimento de medicamentos, além de contribuir nos custos e no tempo associado ao processo.

Para que seja possível encontrar moléculas promissoras, o preparo do banco de dados é essencial. O primeiro banco, conhecido por Núcleo de Bioensaios, Biossíntese e Ecofisiologia de Produtos Naturais (NuBBE_{DB}) (Pilon *et al.*, 2017), é destacado por sua coleção de moléculas derivadas de produtos naturais brasileiros, contendo mais de 2.000 compostos. O segundo banco, ZINC12 (Irwin *et al.*, 2012), é conhecido como *DrugsNow* e possui uma vasta biblioteca de aproximadamente 12 milhões de ligantes com características *drug-like*. O terceiro banco, *Federal Drug Administration* (FDA), possui uma seleção de mais de 3.000 fármacos comerciais. Além disso, dois bancos de dados adicionais, *Core Library* (CL) e *Express Pick* (EXP), ambos pertencentes à empresa *ChemBridge Corporation*® (San Diego, CA, EUA), foram incorporados ao estudo, somando mais de 1 milhão de moléculas. Esses recursos ampliaram o alcance da triagem virtual, permitindo a identificação de potenciais compostos candidatos com diversidade estrutural e química.

Usando abordagens como, Triagem Virtual (*Virtual Screening*) que desempenha um papel fundamental nessa área, permitindo identificar ligantes com maior afinidade para alvos

biológicos. Ela pode ser baseada em alvos, onde a estrutura da biomolécula alvo (ligante) e suas interações são analisadas com outros compostos, buscando similaridades entre ligantes conhecidos para prever interações com compostos novos (Domingues; Lopes, 2012).

No contexto do desenvolvimento de inibidores para a enzima TR de LI, técnicas avançadas como *docking* molecular e dinâmica molecular têm sido aplicadas. O *docking* avalia a interação de ligantes em diferentes posições no sítio ativo da enzima (Hawkins *et al.*, 2007), enquanto a dinâmica molecular (DM) simula o ambiente celular para prever a movimentação, estabilidade, flexibilidade, rigidez, flutuações de forma atômica e a qualidade das ligações (Hollingsworth; Dror, 2018).

Vale ressaltar que os métodos *in silico* são um processo que demanda tempo devido a grande quantidade de dados para serem analisados das bibliotecas virtuais selecionadas. Esses esforços buscam desenvolver medicamentos anti-*Leishmania* mais eficazes e seguros.

2. JUSTIFICATIVA

A leishmaniose visceral é uma doença negligenciada, é a forma mais grave de leishmaniose, possui tratamento complexo, apresenta diversos efeitos colaterais e que requer longa duração do tratamento. Além disso, se não tratada de forma eficiente, pode levar à óbito. Desta forma, a pesquisa visa a busca de novos inibidores que tenham potenciais necessários para a produção de novos fármacos que possam amenizar os efeitos colaterais da doença e que apresentem melhores resultados que os medicamentos disponíveis.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Utilizar métodos computacionais visando a prospecção de potenciais inibidores da TR de *L. infantum*, buscando desenvolver novos fármacos.

3.2. Objetivos Específicos

- Construir um modelo baseado em forma a partir do modelo obtido do PDB em complexo com a TR de *L. infantum*.

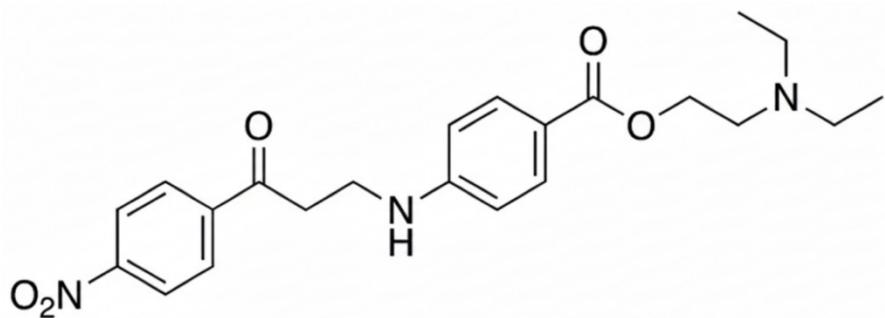
- Observar as interações entre a TR de *L. infantum* e as moléculas com melhores avaliações da triagem virtual e o *docking*.
- Analisar as propriedades farmacocinéticas das moléculas selecionadas pelo pkCSM.
- Realizar a dinâmica molecular das principais moléculas selecionadas.
- Selecionar os potenciais inibidores da TR de *L. infantum*.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Geração do modelo baseado em forma do ligante

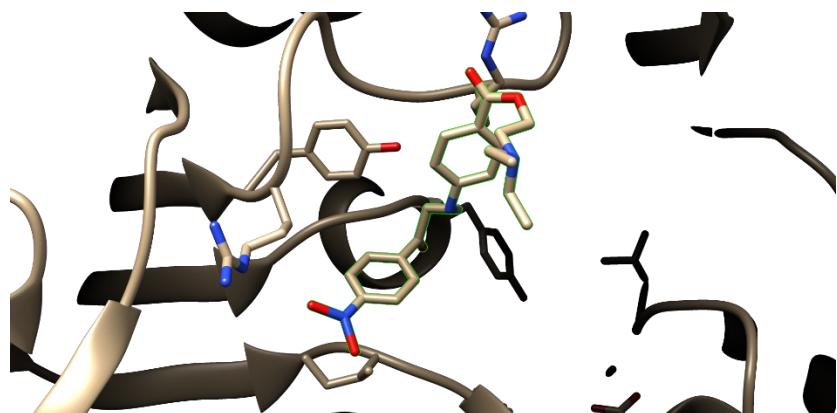
A construção do modelo farmacofórico ocorreu a partir da estrutura cristalina do complexo entre a 2-(dietilamino)etil 4-((3-(4-nitrofenil)-3-oxopropil)amino)benzoato (BVN) (Figura 2) e a TR *L. infantum* (PDB: 6ER5) (Figura 3) (Turcano *et al.*, 2018) por meio do software vROCS 3.5.1.1, (*OpenEye Scientific Software*, Santa Fe, NM <http://www.eyesopen.com>) (Hawkins; Skillman; Nicholls, 2007). Esse modelo, baseia-se na comparação de formas moleculares e na definição de características químicas específicas (como doadoras e aceitoras de hidrogênio, ânions, cátions, regiões hidrofóbicas e anéis aromáticos), o que permitiu a identificação de compostos com similaridade estrutural e química ao ligante de referência na biblioteca virtual.

Figura 2 – Estrutura 2D do BVN.



Fonte: autoria própria (2025)

Figura 3 - complexo BVN e a TR *L. infantum* (PDB: 6ER5).



Fonte: autoria própria (2025)

4.2. Preparo do bancos de dados

O modelo desenvolvido na etapa anterior, foi empregado na triagem virtual de bibliotecas de compostos de cinco diferentes bancos de dados (NUBBE, ZINC12, FDA, CL e EXP).

As bibliotecas de compostos foram analisadas usando o *software* FILTER do OMEGA 2.5.1.4 (*OpenEye Scientific Software*, Santa Fe, NM <http://www.eyesopen.com>) (Hawkins *et al.*, 2010).

Após a etapa de filtragem, as moléculas selecionadas foram processadas pelo software QUACPAC 1.6.3.1 (*OpenEye Scientific Software*, Santa Fe, NM <http://www.eyesopen.com>). Essa etapa foca na avaliação dos valores de pKa e dos tautômeros de cada composto, com o objetivo de determinar cargas elétricas precisas que sejam compatíveis com o pH (potencial hidrogeniônico) do sangue. Esse ajuste é essencial para garantir que os compostos tenham a protonação correta.

Em seguida, as bibliotecas refinadas foram submetidas ao *software* OMEGA para a geração de confôrmeros. Essa etapa é crucial na triagem virtual, pois a identificação de conformações bioativas adequadas pode melhorar significativamente os resultados dos modelos farmacofóricos (Hawkins *et al.*, 2010).

4.3. Triagem virtual e docking

A triagem virtual dos compostos ocorreu utilizando o software vROCS (Hawkins; Skillman; Nicholls, 2007), aplicando o *score TanimotoCombo*, para classificar as 500 melhores moléculas com base em sua similaridade estrutural ao modelo. Após essa seleção, os compostos passaram por *docking* molecular usando o programa GOLD 2021.2 (*The Cambridge Crystallographic Data Centre – CCDC, Cambridge, UK.* <https://www.ccdc.cam.ac.uk/solutions/csd-discovery/components/gold/>) (Jones *et al.*, 1997), que avalia a interação entre as proteínas e os ligantes de maneira flexível e ranqueia os melhores resultados com o algoritmo CHEMPLP.

4.4. Análise de propriedades farmacocinéticas *in silico*

Os compostos selecionados foram analisados pelo servidor pkCSM (Pires; Blundell; Ascher, 2015) para prever suas propriedades farmacocinéticas: absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade (ADMET). Essas propriedades geram previsões que são essenciais para determinar se os compostos selecionados possuem características farmacológicas ideais e uma biodisponibilidade oral aceitável, podendo garantir que sejam potenciais candidatos a fármacos.

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

Utilizando o programa LigPlot+ 2.2 (*European Bioinformatics Institute – EMBL-EBI, Hinxton, Cambridge, UK.* <https://www.ebi.ac.uk/thornton-srv/software/LigPlus/>) (Laskowski; Swindells, 2011), foram gerados diagramas 2D que mostram as interações intermoleculares entre cada ligante com a proteína TR.

4.6. Dinâmica Molecular (DM)

Os compostos que apresentaram resultados promissores nas etapas anteriores passaram pela técnica de DM de receptor-ligante utilizando o *software* GROMACS 2021.4 (*Royal Institute of Technology – KTH, Stockholm, Sweden.* <https://www.gromacs.org/>) (Abraham *et al.*, 2015). Para realizar a dinâmica, o ligante, o FAD e a proteína foram separados pelo *software*

Chimera 1.17, (Resource for Biocomputing, Visualization, and Informatics – University of California, San Francisco, CA, USA. <https://www.cgl.ucsf.edu/chimera/>) (Pettersen *et al.*, 2004), em seguida, as parametrizações dos ligantes selecionados e do FAD, foram criadas utilizando seus respectivos *smiles* retirados do PDB e salvos em .mol2, por fim, adicionados ao servidor online *SwissParam* (Zoete *et al.*, 2011).

Cada simulação da dinâmica adotou o campo de força CHARMM27 e o modelo de água TIP3P como parâmetros. Uma caixa contendo todo o complexo envolvido na dinâmica foi configurada, com adição de água e íons. Em seguida, realizou-se uma minimização de energia com o algoritmo. A simulação da DM foi então conduzida por 100 nanossegundos, sob condições normais de temperatura e pressão.

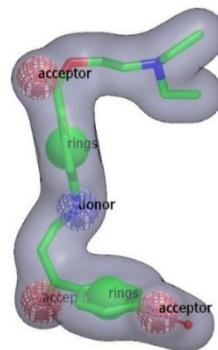
Os seguintes métodos foram aplicados para analisar os resultados da dinâmica molecular das duas moléculas selecionadas do NUBBE (877 e 1208), do BVN e da APO: Desvio Quadrático Médio (RMSD), Flutuação Quadrática Média (RMSF), número de ligações de hidrogênio e análise da energia de ligação (utilizando o método MMPBSA) (Hollingsworth; Dror, 2018).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Geração do modelo baseado em forma do ligante

O modelo baseado em forma foi gerado a partir da estrutura do inibidor BVN retirado do *Protein Data Bank* (PDB id.: 6ER5), em seguida, analisado pelo *software* vROCS (Hawkins; Skillman; Nicholls, 2007). Na Figura 4 observa-se as esferas verdes representando os pontos de interação hidrofóbicas, a azul é doadora de elétrons, as vermelhas são aceptores de elétrons e em cinza representa o volume e o formato do modelo.

Figura 4 – Modelo baseado em forma a partir do inibidor BVN extraído do PDB id.: 6ER5.



Fonte: autoria própria (2025)

5.2. Preparo do bancos de dados

Os cinco banco de dados foram devidamente filtrados e tratados pelo software QUACPAC eliminando os compostos indesejáveis, o estado de protonação e desprotonação, tautômeros. Em seguida, as moléculas de cada banco de dados foram submetidas ao *software* OMEGA para a geração de confôrmeros bioativos. (Hawkins *et al.*, 2010).

5.3. Triagem virtual e *docking*

A triagem virtual das bibliotecas contra o modelo baseado em forma resultou em 500 moléculas selecionadas (em função da pontuação *TanimotoCombo*) de cada banco de dados (NuBBE_{DB}, FDA, CL, EXP e ZINC12 (*DrugsNow*)), obtidas pelo programa vROCS. O programa avaliou a posição do encaixe de cada ligante no modelo a partir da forma e suas propriedades químicas.

Em seguida, as moléculas que apresentaram os melhores resultados na triagem foram submetidas ao programa de *docking* GOLD e seu resultados ranqueados pelo algoritmo CHEMPLP, essa pontuação demonstra as diferentes posições que cada ligante pode obter no sítio de ligação do receptor. Assim, na Tabela 1, apresenta as dez melhores moléculas que foram selecionadas dentre os cinco bancos de dados.

Tabela 1 – *Ranking* do *docking*, pontuação CHEMPLP e *smiles* das 10 melhores moléculas selecionadas.

Ranking	Banco de Dados - Ligante	CHEMPLP	SMILES
1º	NUBBE - 877	84.87	CC(=CCc1cc(ccc1O)CCC(=O)c2c(cc3c(c2O)CCC(O3)(C)C)O)C
2º	NUBBE - 1208	79.65	C[C@@]12CCCC([C@H]1Cc3cc(ccc3O2)CCC(=O)c4c(cc5c(c4O)CCC(O5)(C)C)O)(C)C
3º	FDA - 607986	77.47	c1cc2c(cc1F)CC[C@H]O2[C@H]C[NH2+]C[C@H]([C@H]3CCc4cc(ccc4O3)F)O)O
4º	CL - 78432	77.35	Cc1ccc(nc1)C2(CCN(CC2)C(=O)CCC(=O)c3ccc(cc3)OC)O
5º	CL - 313220	77.09	COc1ccc(cc1)C(=O)CCC(=O)N2CCC(CC2)(c3cccnc3)O
6º	FDA - 537805	77.06	COc1ccc(cc1C(=O)NCCc2ccc(cc2)[S@@]([=N/C(=N/C3CCCCC3)/O](=O)[O-])Cl
7º	FDA - 537791	76.93	CCC1=C(CN(C1=O)/C(=N/CCc2ccc(cc2)[S@@]([=NC(=O)NC3CC(C(CC3)C)(=O)[O-])/O)C
8º	FDA - 19796080	75.60	c1ccc2c(c1)nc(n2C3=CC[N@@H+](CC3)CCCC(=O)c4ccc(cc4)F)O
9º	FDA - 9212428	75.22	c1cc(ccc1C(=O)N[C@@H](CCC(=O)[O-])C(=O)[O-])NC[C@@H]2CNc3c(c(=O)[nH]c(n3)N)N2C=O
10º	FDA - 1529323	75.22	[H]/N=c/1\c2c(ncc(n2)CN(C)c3ccc(cc3)/C(=N/[C@@H](CCC(=O)[O-])C(=O)[O-])/O)nc([nH]1)N

Fonte: autoria própria (2025)

5.4. Análise de propriedades farmacocinéticas *in silico*

As 10 melhores moléculas selecionadas passaram pela análise de farmacocinética, juntamente com a molécula modelo (BVN), para comparação das propriedades ADMET pelo servidor pkCSM, como é mostrado na Tabela 2 e no Anexo A.

Foram analisados: a toxicidade AMES, avalia o potencial carcinogênico das moléculas, desta forma, o resultado positivo indica que o composto é mutagênico; a máxima dose tolerada (humana), fornece uma estimativa do limite de dose tóxica de compostos químicos em humanos, assim, valores acima de 0.477 log (mg/Kg/dia) indicam que a dose pode apresentar alta toxicidade em humanos e quando os valores forem iguais ou menores que 0.477 log (mg/Kg/dia), o nível de toxicidade é baixa; os inibidores dos genes hERG I e II, estão relacionados com a inibição dos canais de potássio que são codificados pelo gene hERG, podendo causar o desenvolvimento da síndrome do QT longo adquirido, que causa a arritmia ventricular fatal; a hepatotoxicidade, analisa o potencial de determinados compostos em causar lesões hepáticas induzidas por determinados medicamentos (Pires; Blundell; Ascher, 2015).

Na Tabela 2, é possível analisar que as moléculas selecionadas dos bancos de dados FDA e CL apresentaram resultados positivos para hepatotoxicidade, desta forma, foram

descartados como potenciais inibidores que possuam baixos efeitos colaterais para os seres humanos. Além disso, é possível perceber que o modelo BVN também possui hepatotoxicidade, é carcinogênico e inibi o gene hERG II. Por fim, a molécula NuBBE 877 apresentou resultado positivo para a inibição do gene hERG II, assim, em testes futuros esse composto deverá ser analisado com maior atenção. Enquanto isso, a molécula NuBBE 1208 apresentou toxicidade aguda em peixes, no entanto, isso não é um fator eliminatório, pois o foco é a interação em humanos.

Apenas duas moléculas do banco de dados NUBBE_{DB} apresentaram resultados farmacocinéticos promissores: NuBBE 877 e NuBBE 1208.

Tabela 2 – Resultado de Toxicidade das 10 melhores moléculas em comparação ao inibidor BVN.

ADMET – Toxicidade	Toxicidade AMES	Max. Dose tolerada (humana)	Inibidor hERG I	Inibidor hERG II	Hepatotoxicidade
BVN – inibidor	Sim	0.257	Não	Sim	Sim
NUBBE 1208	Não	-0.215	Não	Não	Não
NUBBE 877	Não	-0.054	Não	Sim	Não
CL 78432	Não	0.013	Não	Não	Sim
CL 313220	Não	-0.290	Não	Não	Sim
FDA 19796080	Sim	-0.246	Não	Sim	Sim
FDA 537805	Não	0.508	Não	Não	Sim
FDA 9212428	Não	-0.253	Não	Não	Sim
FDA 1529323	Não	0.580	Não	Não	Sim
FDA 607986	Não	-0.197	Não	Sim	Sim
FDA 537791	Não	0.293	Não	Não	Sim

Fonte: autoria própria (2025)

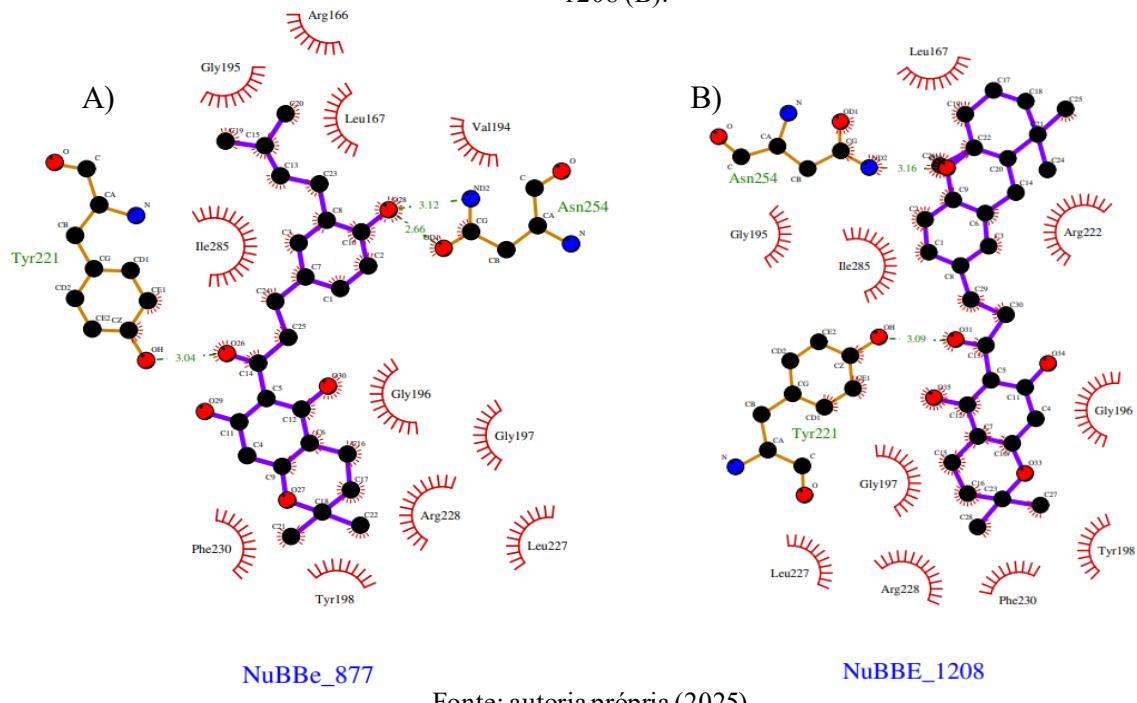
5.5. Geração de diagramas de interação 2D proteína-ligante

Na Figura 5, estão representados os diagramas de interação 2D dos ligantes selecionados com a proteína alvo (TR de LI): a NuBBE 877 e a NuBBE 1208. As estruturas foram geradas pelo programa LigPlot+ (Laskowski; Swindells, 2011).

Nos diagramas, é possível observar os ligantes (na cor roxa) de cada molécula interagindo com o sítio ativo da TR. Os círculos pretos correspondem aos átomos de carbono, em vermelho são os átomos de oxigênio e em azul são os átomos de nitrogênio. As formas em linhas vermelhas ao redor dos ligantes correspondem aos aminoácidos envolvidos em interações hidrofóbicas e as linhas tracejadas em verde representam as ligações de hidrogênio.

A molécula NuBBE 1208 possui uma interação hidrofóbica a menos do que a NuBBE 877, apresenta três ligações de hidrogênio, enquanto a NuBBE 877 apresenta duas ligações de hidrogênio. Essas ligações de hidrogênio são feitas com os mesmos aminoácidos, Tyr221 e Asn254. Ambas as moléculas possuem interações hidrofóbicas com os mesmos aminoácidos do sítio da TR: Gly195, Leu167, Ile285, Gly196, Gly197, Arg228, Leu227, Phe230 e Tyr198, com exceção da Val194 e Arg166 (NuBBE 877) e Arg222 (NuBBE 1208). Ademais, todas essas interações contribuem para a estabilidade e especificidade das ligações das moléculas no sítio ativo (Scheiner, 2015).

Figura 5 – Diagramas de interação 2D proteína-ligante das moléculas NuBBE 877 (A) e NuBBE 1208 (B).



5.6. Dinâmica Molecular (DM)

As duas melhores moléculas do banco de dados NUBBE_{DB}, o modelo BVN (PDB: 6ER5) e a APO (proteína sem o ligante) foram submetidas às simulações de DM, pelo *software* GROMACS (Abraham *et al.*, 2015). Essa metodologia computacional gera simulações dos movimentos de cada átomos e moléculas ao longo do tempo, em um período de 100 nanosegundos (ns). Desta forma, é possível analisar o comportamento entre as interações ligante-proteína para avaliar possíveis alterações nas conformações, na estabilidade da proteína após cada conformação e analisar as informações sobre o mecanismo entre as interações dos

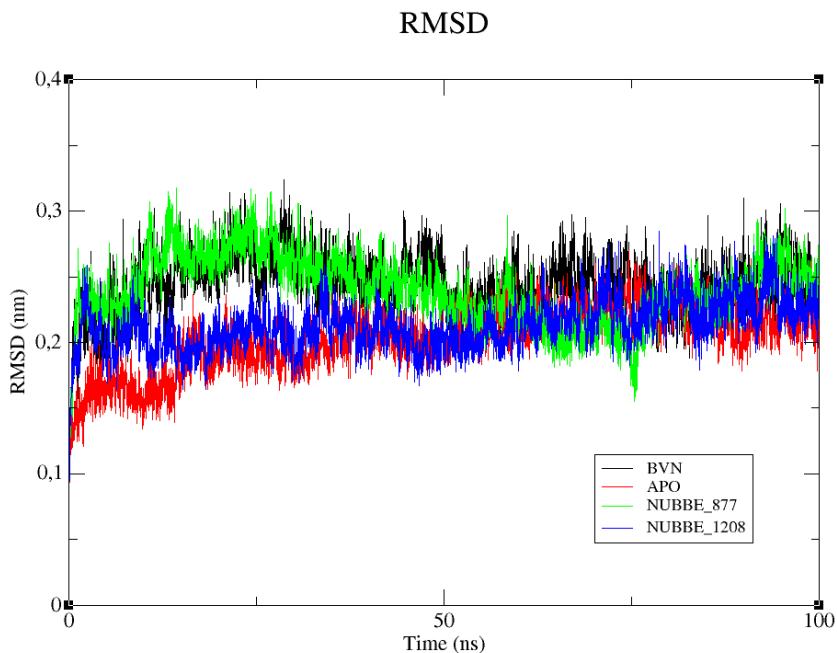
complexos à nível molecular (Hollingsworth; Dror, 2018). Além disso, os complexos foram visualizados pelo *software Visual Molecular Dynamics* (VMD), para que seja possível conferir se o ligante está em sua respectiva posição na proteína (Humphrey; Dalke; Schulten, 1996).

5.6.1. Análise do RMSD

Após a simulação da DM foi utilizada a métrica de desvio quadrático médio (RMSD) para analisar a estabilidade e a distância dos átomos da proteína ao longo do tempo (100 ns) (Sargsyan; Grauffel; Lim, 2017). Na Figura 6, é mostrado o resultado RMSD, realizado com as Backbones dos complexos: modelo BVN (PDB: 6ER5), APO, NUBBE 877 E NUBBE 1208.

Os valores médios e desvios padrão de RMSD ao longo de 100 ns para o modelo BVN, a proteína APO (sem o ligante), os complexos NuBBE 877 e NuBBE 1208, foram determinados em aproximadamente 0.25 ± 0.04 , 0.20 ± 0.02 , 0.24 ± 0.03 e 0.21 ± 0.02 nm, respectivamente. Os complexos do modelo BVN e NuBBE_877 apresentaram maior oscilação durante a DM e apresentaram estabilidade ao final, próximos do tempo de 100 ns. Enquanto a APO apresentou um pequeno crescimento ao longo do tempo e estabilizando ao final. Por fim, o complexo NuBBE 1208 demonstrou maior equilíbrio ao longo do tempo dentre os complexos estudados.

Figura 6 – RMSD: Desvio quadrático médio, dos complexos BVN, APO, NUBBE 877 E NUBBE 1208.



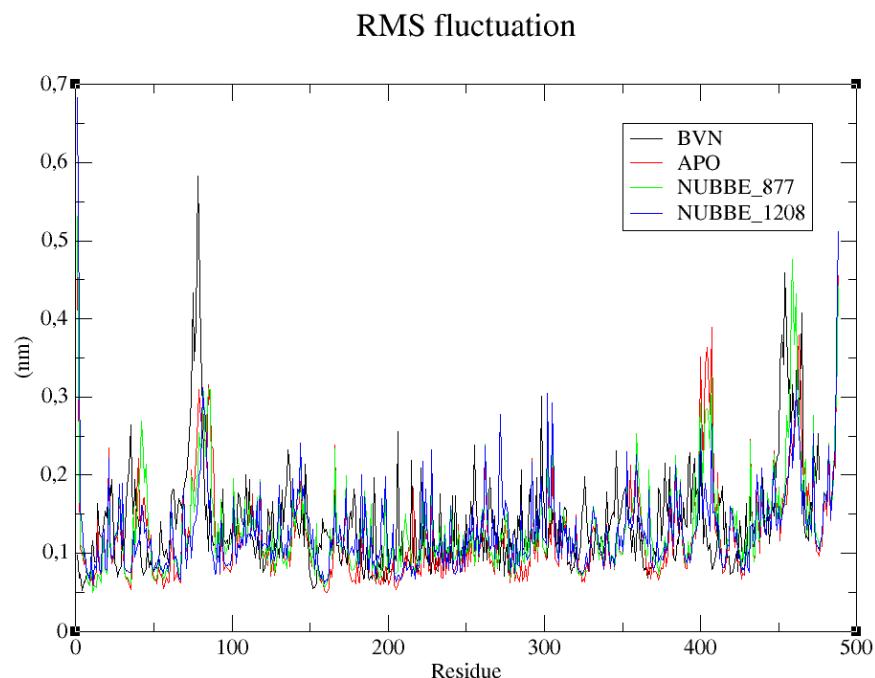
Fonte: autoria própria (2025)

5.6.2. Análise da RMSF

Para compreender o deslocamento e a estabilidade de cada resíduo (aminoácido) na trajetória da simulação da DM, foi realizado o método da flutuação quadrática média (RMSF). Na Figura 7 é possível observar as sobreposições das principais interações, assim, pode-se analisar as regiões com valores altos de RMSF (nm) indicando maior flexibilidade, enquanto os valores menores indicam maior rigidez.

Os valores médios e desvios padrão de RMSF ao longo de 100 ns para o modelo BVN, a proteína APO (sem o ligante), os complexos NuBBE 877 e NuBBE 1208, foram determinados em aproximadamente 0.14 ± 0.07 , 0.12 ± 0.06 , 0.13 ± 0.06 e 0.13 ± 0.06 nm, respectivamente. Logo, o método RMSF foi eficaz para determinar e avaliar a flexibilidade local nas estruturas proteicas, podendo identificar as áreas flexíveis e rígidas. Como observado, os principais resíduos apresentaram rigidez durante a dinâmica, desta forma, demonstrou que os ligantes BVN, NUBBE 877 e NUBBE 1208, ligados à proteína, resultaram em uma conformação estável e sem mudanças significativa na estrutura da proteína (Sargsyan; Grauffel; Lim, 2017).

Figura 7 – RMSF: Flutuação Quadrática Média dos complexos BVN, APO, NUBBE 877 E NUBBE 1208.

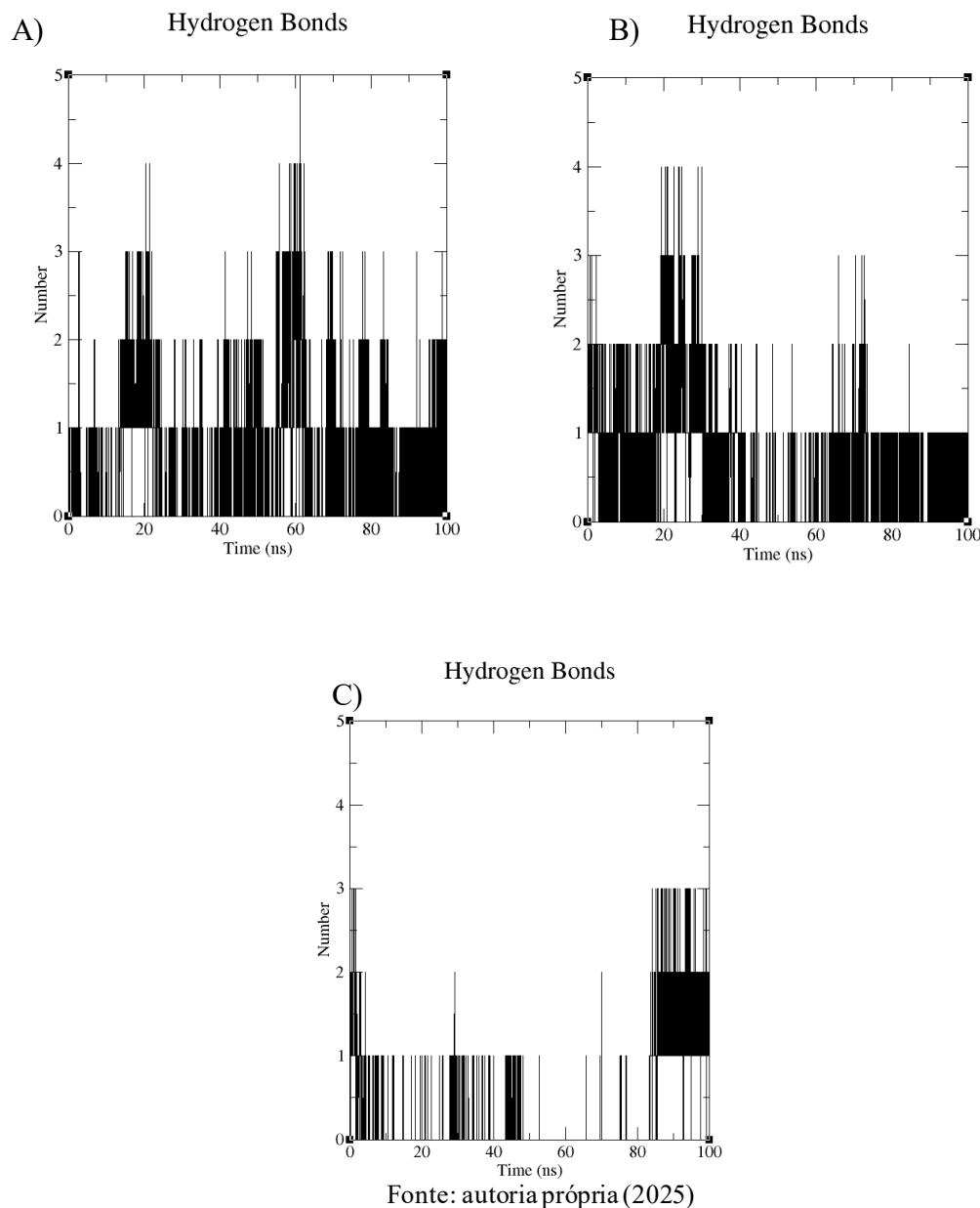


Fonte: autoria própria (2025)

5.6.3. Análise das ligações de hidrogênio

Esta etapa da DM determina o número de ligações de hidrogênio intermoleculares, sua análise é importante para determinar estabilidade dos complexos proteicos selecionados (Arnittali; Rissanou; Harmandaris, 2019). Na Figura 8, podemos perceber que no complexo BVN as ligações de hidrogênio variaram de 0 a 5, NUBBE 877 de 0 a 4 e NUBBE 1208 de 0 a 3, ao longo do tempo de 100 ns. Os gráficos A e B apresentam melhor estabilidade que o gráfico C, corresponde respectivamente aos complexos, BVN, NUBBE 877 e NUBBE 1208. As ligações de hidrogênio da NUBBE 1208 apresentam estabilidade tardia ao longo dos 100 ns.

Figura 8 – Ligação de hidrogênio: BVN (A), NUBBE 877 (B) e NUBBE 1208 (C) ao longo do tempo (100 ns).



Fonte: autoria própria (2025)

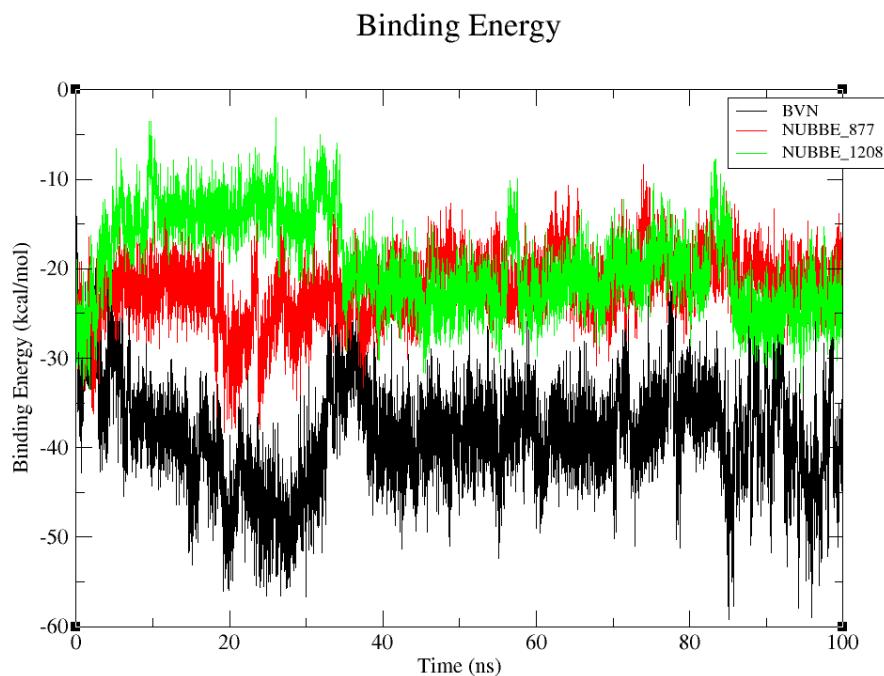
5.6.4. Análise das energias de ligação

A análise de energia foi realizada por meio do método *Molecular Mechanics Poisson – Boltzmann Surface Area* (MMPSA), fornecendo resultados sobre a força e estabilidade das interações biomoleculares dos complexos selecionados. (Genheden; Ryde, 2015).

Os valores médios e desvios padrão da energia de ligação ao longo de 100 ns para o modelo BVN, os complexos NuBBE 877 e NuBBE 1208, foram determinados em aproximadamente -37.9 ± 9.49 , -22.15 ± 3.68 e -19.45 ± 5.08 kcal/mol, respectivamente.

Todos os complexos apresentaram energia de ligação negativa, quanto mais negativo, mais forte é a ligação do ligante à proteína, desta forma, na Figura 9 é possível perceber que o modelo BVN possui maior ligação em comparação as duas moléculas selecionadas (NUBBE 877 e NUBBE 1208), mas isso não significa que os respectivos ligantes não sejam eficientes em manterem forte ligação ao sítio ativo, já que a partir dos 50 ns a energia de ligação dos compostos NUBBE tendem a formar um platô.

Figura – 9: análise de energia dos complexos BVN, NUBBE 877 E NUBBE 1208.



Fonte: autoria própria (2025)

6. CONCLUSÃO

A abordagem *in silico* apresentou resultados promissores, na geração do modelo farmacofórico, auxiliando na triagem virtual e no *docking* molecular, resultando em dois melhores compostos – NuBBE 877 e NuBBE 1208 – para a inibição da TR de LI. Além disso, esses compostos obtiveram resultados satisfatórios durante a análise da DM. Desta forma, os dados apresentados sugerem novos caminhos para o desenvolvimento de terapias contra a leishmaniose visceral, o que pode apresentar um impacto significativo na produção de novos fármacos e ao combate a essa doença.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAHAM, Mark James *et al.* GROMACS: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers. *SoftwareX*, v. 1, p. 19-25, 2015.

ARNITTALI, Maria; RISSANOU, Anastassia N.; HARMANDARIS, Vagelis. Structure of biomolecules through molecular dynamics simulations. *Procedia Computer Science*, v. 156, p. 69-78, 2019.

BATTISTA, Theo *et al.* Targeting trypanothione reductase, a key enzyme in the redox trypanosomatid metabolism, to develop new drugs against leishmaniasis and trypanosomiases. *Molecules*, v. 25, n. 8, p. 1924, 2020.

BRASIL, Ministério da Saúde. Situação epidemiológica da Leishmaniose Visceral. Brasília, 2024. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/l/leishmaniose-visceral/situacao-epidemiologica-da-leishmaniose-visceral>. Acesso em: 08 jul. 2024.

BRASIL, Ministério da Saúde. Leishmaniose Visceral. Brasília, 2024. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/l/leishmaniose-visceral>. Acesso em 08 jul. 2024.

BERMAN, Helen M. *et al.* The protein data bank. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, v. 58, n. 6, p. 899-907, 2002.

GENHEDEN, Samuel; RYDE, Ulf. The MM/PBSA and MM/GBSA methods to estimate ligand-binding affinities. *Expert opinion on drug discovery*, v. 10, n. 5, p. 449-461, 2015.

HAWKINS, Paul CD *et al.* 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*, v. 50, n. 4, p. 572-584, 2010.

HAWKINS, Paul CD; SKILLMAN, A. Geoffrey; NICHOLLS, Anthony. Comparison of shape-matching and docking as virtual screening tools. *Journal of medicinal chemistry*, v. 50, n. 1, p. 74-82, 2007.

HOLLINGSWORTH, Scott A.; DROR, Ron O. Molecular dynamics simulation for all. *Neuron*, v. 99, n. 6, p. 1129-1143, 2018.

HUMPHREY, William; DALKE, Andrew; SCHULTEN, Klaus. VMD: visual molecular dynamics. *Journal of molecular graphics*, v. 14, n. 1, p. 33-38, 1996.

IRWIN, John J. *et al.* ZINC: a free tool to discover chemistry for biology. *Journal of chemical information and modeling*, v. 52, n. 7, p. 1757-1768, 2012.

JONES, Gareth *et al.* Development and validation of a genetic algorithm for flexible docking. *Journal of molecular biology*, v. 267, n. 3, p. 727-748, 1997.

KUMARI, Rashmi *et al.* g_mmpbsa A GROMACS tool for high-throughput MM-PBSA calculations. *Journal of chemical information and modeling*, v. 54, n. 7, p. 1951-1962, 2014.

LASKOWSKI, Roman A.; SWINDELLS, Mark B. LigPlot+: multiple ligand–protein interaction diagrams for drug discovery. 2011.

MOREIRA, A. DE M. *et al.* ASPECTOS FUNDAMENTAIS DA LEISHMANIOSE CUTÂNEA NO BRASIL. Em: Ações de Saúde e Geração de Conhecimento nas Ciências Médicas 3. [s.l.] Atena Editora, 2020. p. 69–79.

PETTERSEN, Eric F. *et al.* UCSF Chimera—a visualization system for exploratory research and analysis. *Journal of computational chemistry*, v. 25, n. 13, p. 1605-1612, 2004.

PILON, Alan C. *et al.* NuBBEDB: an updated database to uncover chemical and biological information from Brazilian biodiversity. *Scientific Reports*, v. 7, n. 1, 1 dez. 2017.

PITA, Samuel S. da R.; PASCUTTI, Pedro G. Therapeutic Targets in Chagas' Disease: a Focus on Trypanothione Reductase. **Revista Virtual de Química**, v. 3, n. 4, p. 307-324, 2011.

PIRES, Douglas EV; BLUNDELL, Tom L.; ASCHER, David B. pkCSM: predicting small-molecule pharmacokinetic and toxicity properties using graph-based signatures. *Journal of medicinal chemistry*, v. 58, n. 9, p. 4066-4072, 2015.

SANTIAGO, Alexandre Silva; DA ROCHA PITA, Samuel Silva; GUIMARÃES, Elisalva Teixeira. Tratamento da leishmaniose, limitações da terapêutica atual e a necessidade de novas alternativas: Uma revisão narrativa. *Research, Society and Development*, v. 10, n. 7, p. e29510716543-e29510716543, 2021

SARGSYAN, Karen; GRAUFFEL, Cédric; LIM, Carmay. How molecular size impacts RMSD applications in molecular dynamics simulations. *Journal of chemical theory and computation*, v. 13, n. 4, p. 1518-1524, 2017.

SCHEINER, Steve (Ed.). *Noncovalent forces*. Springer, 2015.

SUNDAR, Shyam; CHAKRAVARTY, Jaya. Leishmaniasis: an update of current pharmacotherapy. *Expert opinion on pharmacotherapy*, v. 14, n. 1, p. 53-63, 2013.

TURCANO, Lorenzo *et al.* Identification and binding mode of a novel Leishmania Trypanothione reductase inhibitor from high throughput screening. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 12, n. 11, p. e0006969, 2018.

VALLI, Marilia *et al.* Development of a natural products database from the biodiversity of Brazil. *Journal of Natural Products*, v. 76, n. 3, p. 439-444, 2013.

ZOETE, Vincent *et al.* SwissParam: a fast force field generation tool for small organic molecules. *Journal of computational chemistry*, v. 32, n. 11, p. 2359-2368, 2011.

ANEXO A – TABELAS COMPLEMENTARES DO PKCSM

Tabela A.1 – Análise farmacocinética da Absorção pelo site pkCSM das 10 melhores moléculas selecionadas.

ADMET - Absorção	Solubilidade em Água	Permeabilidade Caco2	Absorção intestinal (humana)	Permeabilidade cutânea	Substrato de P-glicoproteína	Inibidor de P-glicoproteína I	Inibidor de P-glicoproteína II
BVN - inibidor	-4.648	0.142	80.931	-2.739	Sim	Sim	Sim
NUBBE 1208	-5.271	0.759	92.09	-2.841	Sim	Sim	Sim
NUBBE 877	-4.123	0.766	89.164	-2.754	Sim	Sim	Sim
CL 78432	-3.969	1.275	94.597	-3.196	Sim	Não	Não
CL 313220	-3.386	1.110	94.236	-3.259	Sim	Sim	Sim
FDA 19796080	-2.864	0.923	85.331	-2.735	Sim	Sim	Sim
FDA 537805	-3.986	0.759	64.703	-2.735	Não	Não	Sim
FDA 9212428	-2.835	-0.713	0	-2.735	Sim	Não	Não
FDA 1529323	-3.246	-0.172	10.887	-2.735	Sim	Não	Não
FDA 607986	-2.666	0.930	92.349	-2.783	Sim	Não	Sim
FDA 537791	-3.226	0.606	63.178	-2.734	Sim	Não	Sim

Fonte: autoria própria (2025)

Tabela A.2 – Análise farmacocinética de Distribuição pelo site pkCSM das 10 melhores moléculas selecionadas.

ADMET – Distribuição	VDss (humana)	Fração não ligada (humana)	Permeabilidade da Barreira Hematoencefálica (BHE)	Permeabilidade do SNC (Sistema Nervoso Central)
BVN - inibidor	0.555	0.017	-0.766	-2.847
NUBBE 1208	0.594	0	-0.109	-1.542
NUBBE 877	0.444	0.011	-0.820	-2.028
CL 78432	-0.120	0.135	-0.403	-2.488
CL 313220	0.122	0.192	-0.397	-2.679
FDA 19796080	-0.637	0.134	0.284	-2.432
FDA 537805	-2.011	0	-1.068	-2.330
FDA 9212428	-0.705	0.624	-1.283	-3.948
FDA 1529323	-2.041	0.480	-1.180	-3.402
FDA 607986	0.700	0.328	-0.644	-3.186
FDA 537791	-1.788	0.225	-1.081	-2.438

Fonte: autoria própria (2025)

Tabela A.3 – Análise farmacocinética de Metabolismo pelo site pkCSM das 10 melhores moléculas selecionadas.

ADMET - Metabolismo	Substrato de CYP2D6	Substrato de CYP3A4	Inibidor de CYP1A2	Inibidor de CYP2C19	Inibidor de CYP2C9	Inibidor de CYP2D6	Inibidor de CYP3A4
BVN - inibidor	Não	Sim	Não	Sim	Sim	Não	Sim
NUBBE 1208	Não	Sim	Não	Sim	Sim	Não	Sim
NUBBE 877	Não	Sim	Não	Sim	Sim	Não	Sim
CL 78432	Não	Sim	Não	Sim	Sim	Não	Não
CL 313220	Não	Sim	Não	Sim	Não	Não	Sim
FDA 19796080	Não	Sim	Sim	Sim	Não	Sim	Não
FDA 537805	Não	Não	Não	Não	Sim	Não	Não
FDA 9212428	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não
FDA 1529323	Não	Sim	Não	Não	Não	Não	Não
FDA 607986	Não	Sim	Não	Não	Não	Não	Sim
FDA 537791	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não

Fonte: autoria própria (2025)

Tabela A.4 – Análise farmacocinética de Excreção pelo site pkCSM das 10 melhores moléculas selecionadas.

ADMET - Excreção	Depuração total	Substrato de OCT2 renal
BVN - inibidor	0.771	Não
NUBBE 1208	-0.187	Não
NUBBE 877	0.432	Não
CL 78432	0.437	Não
CL 313220	0.545	Não
FDA 19796080	1.284	Sim
FDA 537805	0.088	Não
FDA 9212428	0.165	Não
FDA 1529323	0.718	Não
FDA 607986	0.970	Não
FDA 537791	0.605	Não

Fonte: autoria própria (2025)