

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
CURSO DE BIOTECNOLOGIA

Identificação de potenciais inibidores bioativos para *Candidatus Liberibacter asiaticus*: Uma abordagem computacional contra o agente causador do *Huanglongbing* (HLB)

Victor Rodrigues Terra

Uberlândia – MG

2026

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
CURSO DE BIOTECNOLOGIA

Identificação de potenciais inibidores bioativos para *Candidatus Liberibacter asiaticus*: Uma abordagem computacional contra o agente causador do *Huanglongbing* (HLB)

Victor Rodrigues Terra

Orientador: Prof. Dr. Nilson Nicolau Junior

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

Uberlândia – MG

2026

Ficha Catalográfica Online do Sistema de Bibliotecas da UFU
com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

T323 2026	Terra, Victor Rodrigues, 1990- Identificação de potenciais inibidores bioativos para <i>Candidatus Liberibacter asiaticus</i>: Uma abordagem computacional contra o agente causador do Huanglongbing (HLB) [recurso eletrônico] / Victor Rodrigues Terra. - 2026. Orientador: Nilson Nicolau Junior. Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) - Universidade Federal de Uberlândia, Graduação em Biotecnologia. Modo de acesso: Internet. Inclui bibliografia. Inclui ilustrações. 1. Biotecnologia. I. Nicolau Junior, Nilson ,1981-, (Orient.). II. Universidade Federal de Uberlândia. Graduação em Biotecnologia. III. Título. CDU: 60
--------------	--

Bibliotecários responsáveis pela estrutura de acordo com o AACR2:
Gizele Cristine Nunes do Couto - CRB6/2091
Nelson Marcos Ferreira - CRB6/3074

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
CURSO DE BIOTECNOLOGIA

Identificação de potenciais inibidores bioativos para *Candidatus Liberibacter asiaticus*: Uma abordagem computacional contra o agente causador do *Huanglongbing* (HLB)

Victor Rodrigues Terra

Prof. Dr. Nilson Nicolau Junior
Instituto de Biotecnologia

Homologado pela coordenação do curso de
Biotecnologia em Março de 2026

Uberlândia – MG

2026

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
CURSO DE BIOTECNOLOGIA

Identificação de potenciais inibidores bioativos para *Candidatus Liberibacter asiaticus*: Uma abordagem computacional contra o agente causador do *Huanglongbing* (HLB)

Victor Rodrigues Terra

Aprovado pela Banca Examinadora em: 20 / 03 / 2026

Nota: 95

Nome e assinatura do Presidente da Banca Examinadora:

Prof. Dr. Nilson Nicolau Junior

Nome e assinatura do 1º Membro da Banca Examinadora:

Profa. Dra. Ana Paula Oliveira Nogueira

Nome e assinatura do 2º Membro da Banca Examinadora:

Bárbara Rodrigues

Uberlândia, 20 de Março de 2026.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer à minha mãe, Maristela, que sempre me apoiou em minhas escolhas e me proporcionou o que era necessário para conseguir trilhar essa jornada. Sem ela, nada disso seria possível e eu dificilmente teria forças para realizar um sonho tão antigo.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Nilson Nicolau Junior, por toda a sua confiança e suporte durante esse processo. Graças a ele, aprendi muitas coisas que irão me guiar ao longo de minha trajetória, tanto em minha profissão como na minha vida pessoal.

Além disso, queria expressar minha gratidão ao Doutorando José Augusto Leoncio Gomide, por seu amparo e paciência durante esse trabalho. Suas sugestões foram de grande valia, me permitindo extrair ao máximo todo o potencial do meu projeto.

Da mesma forma, sou grato aos meus colegas de laboratório e aos amigos que fiz no decorrer de minha formação acadêmica. Pelo apoio e momentos de aprendizado mútuo, fundamentais na superação dos desafios da graduação.

Por fim, sou grato à Universidade Federal de Uberlândia (UFU) e ao Instituto de Biotecnologia (IBTEC), pela estrutura e oportunidade de formação. Igualmente, meu sincero reconhecimento ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela oportunidade de continuar meu projeto por meio do meu PIBITI.

RESUMO

O *huanglongbing* (HLB), ou *greening*, é uma das doenças mais graves que afetam a citricultura global, causada principalmente pela bactéria *Candidatus Liberibacter asiaticus*, um fitopatógeno restrito ao floema que tem como inseto vetor o *Diaphorina citri*. A urgência em buscar uma solução reside no severo impacto econômico e social da doença no Brasil, um dos maiores produtores de *Citrus spp.* A inibição específica dos transportadores de aminoácidos da família ABC, como a subunidade de ligação à cistina (TcyA) — essencial para a sobrevivência e defesa antioxidante do microrganismo —, representa uma estratégia crucial de manejo. Desse modo, este trabalho teve como objetivo a identificação de potenciais inibidores bioativos para este receptor, empregando metodologias de química computacional. O fluxo de trabalho envolveu triagem virtual de alto rendimento, modelagem farmacofórica, *docking molecular* e simulações de dinâmica molecular (100 ns). Os resultados culminaram na identificação da molécula semissintética NB_2472, que demonstrou excelente afinidade termodinâmica e capacidade de restringir a flexibilidade conformacional do sítio ativo do receptor. A avaliação complementar evidenciou um perfil ADMET altamente favorável para a NB_2472, atestando ausência de mutagenicidade (Teste de Ames *Safe*), viabilidade de síntese industrial e potencial de translocação sistêmica. Adicionalmente, os compostos NB_2458 e NB_2471 destacaram-se como promissoras alternativas estratégicas, priorizando, respectivamente, segurança toxicológica máxima e baixo custo de síntese. Conclui-se que a abordagem *in silico* aplicada é indispensável para o enfrentamento deste fitopatógeno não cultivável, fornecendo o candidato a bioativo NB_2472 como um protótipo molecular validado e seguro para o avanço das investigações biotecnológicas e testes *in vitro*.

Palavras-chave: *Greening*; Transportador ABC; Dinâmica Molecular; Triagem Virtual; Bioprodutos.

ABSTRACT

Huanglongbing (HLB), or greening, is one of the most severe diseases affecting global citriculture, primarily caused by the bacterium *Candidatus Liberibacter asiaticus*, a phloem-restricted phytopathogen transmitted by the insect vector *Diaphorina citri*. The urgency to find a solution lies in the severe economic and social impact of the disease in Brazil, one of the world's largest producers of *Citrus spp.* The specific inhibition of ABC family amino acid transporters, such as the cystine-binding subunit (TcyA)—essential for the microorganism's survival and antioxidant defense—represents a crucial management strategy. Therefore, this study aimed to identify potential bioactive inhibitors for this receptor using computational chemistry methodologies. The workflow involved *high-throughput virtual screening*, pharmacophore modeling, molecular *docking*, and molecular dynamics simulations (100 ns). The results culminated in the identification of the semisynthetic molecule NB_2472 as the lead candidate, demonstrating excellent thermodynamic affinity and restriction of the active site's conformational flexibility, combined with a highly favorable ADMET profile (absence of mutagenicity, industrial synthesis viability, and systemic translocation potential). Additionally, the compounds NB_2458 and NB_2471 stood out as promising strategic alternatives, prioritizing maximum toxicological *safety* and low synthesis cost, respectively. In conclusion, the applied *in silico* approach is indispensable for combating this unculturable phytopathogen, providing validated and *safe* molecular prototypes for the advancement of biotechnological investigations and *in vitro* tests.

Keywords: Greening; ABC transporter; Molecular dynamics; *Virtual screening*; Bioproducts.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Panorama biológico e agrônômico do <i>huanglongbing</i> (HLB)	1
Figura 2 – Morfoanatomia do cilindro vascular vegetal	2
Figura 3 – Estrutura quaternária da proteína transportadora TcyA	3
Figura 4 – Fluxograma do <i>pipeline</i> metodológico aplicado no estudo <i>in silico</i>	14
Figura 5 – Perfil de RMSD comparativo entre a APO e o complexo de Referência	21
Figura 6 – Estabilidade conformacional otimizada pelo candidato líder NB_2472	22
Figura 7 – Instabilidade conformacional induzida pela molécula MP_70952	23
Figura 8 – Perfil de flutuação residual da proteína livre e do ligante de referência	24
Figura 9 – Restrição de mobilidade do sítio ativo promovida pelo líder NB_2472	25
Figura 10 – Aumento da flutuação residual induzido pela molécula MP_70952	26
Figura 11 – Perfil de ligações de hidrogênio da molécula de referência (8GU1)	27
Figura 12 – Rede de ligações de hidrogênio do candidato líder NB_2472	28
Figura 13 – Escassez de ligações de hidrogênio no complexo com a NB_1260	29
Figura 14 – Evolução da energia livre de ligação do candidato líder NB_2472	30
Figura 15 – Flutuação termodinâmica acentuada no complexo com a MP_8547	31
Figura 16 – Perfil energético de afinidade limítrofe apresentado pela NB_2471	32
Figura 17 – Projeção 2D da Análise de Componentes Principais do controle 8GU1 ...	33
Figura 18 – Restrição do espaço essencial obtida pelos candidatos de alta afinidade ..	34
Figura 19 – Perfis de dispersão estrutural crítica e instabilidade	35

LISTA DE TABELAS

<u>Tabela 1 – Ranqueamento global multiparamétrico dos complexos proteína-ligante ...</u>	<u>36</u>
<u>Tabela 2 – Predições farmacocinéticas, físico-químicas e toxicológicas</u>	<u>38</u>
<u>Tabela 3 – Matriz de Seleção e Veredicto Científico dos candidatos a inibidores</u>	<u>39</u>

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Abreviatura/Sigla	Significado
ABC	<i>ATP-Binding Cassette</i> (Cassete de Ligação ao ATP)
ADMET	Absorção, Distribuição, Metabolismo, Excreção e Toxicidade
Ames	Teste de Ames (Ensaio preditivo de mutagenicidade)
APO	Apoproteína (Estado da enzima livre, sem ligante)
CADD	<i>Computer-Aided Drug Design</i> (Planejamento de Fármacos Assistido por Computador)
CHARMM	Chemistry at HARvard Macromolecular Mechanics (Campo de força)
CLas	<i>Candidatus Liberibacter asiaticus</i>
CLasTcyA	Proteína de ligação à cistina de <i>Candidatus Liberibacter asiaticus</i>
DM	Dinâmica Molecular
ESOL	<i>Estimated Aqueous Solubility</i> (Solubilidade Aquosa Estimada)
GBVI/WSA	<i>Generalized Born Volume Integral / Weighted Surface Area</i> (Função de pontuação)
GROMACS	GROningen MACHine for Chemical Simulations (<i>Software</i>)
hERG	<i>Human Ether-a-go-go-Related Gene</i> (Canal de potássio humano / Teste de cardiotoxicidade)
HLB	<i>Huanglongbing</i> (Doença do <i>Greening</i> dos Citros)
HTS	<i>High-Throughput Screening</i> (Triagem de Alto Rendimento)
Log P	Coefficiente de partição octanol-água (Índice de Lipofilia)
Log S	Coefficiente de solubilidade aquosa
MIP	Manejo Integrado de Pragas
MMFF94x	<i>Merck Molecular Force Field 94x</i> (Campo de força molecular)
MOE	Molecular Operating Environment (<i>Software</i>)
NPT	<i>Ensemble</i> Isotérmico-Isobárico (Número de partículas, Pressão e Temperatura constantes)
NVT	<i>Ensemble</i> Canônico (Número de partículas, Volume e Temperatura constantes)
P-gp	Glicoproteína P (<i>P-glycoprotein</i>)
PBC	<i>Periodic Boundary Conditions</i> (Condições de Contorno Periódicas)
PCA	<i>Principal Component Analysis</i> (Análise de Componentes Principais)
PDB	Protein Data Bank (Banco de Dados de Proteínas)
RCSB	Research Collaboratory for Structural Bioinformatics
RMSD	<i>Root-Mean-Square Deviation</i> (Desvio Quadrático Médio)
RMSF	<i>Root-Mean-Square Fluctuation</i> (Flutuação Quadrática Média)
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i> (Espécies Reativas de Oxigênio)
SA	<i>Synthetic Accessibility</i> (Acessibilidade Sintética)
TPSA	<i>Topological Polar Surface Area</i> (Área de Superfície Polar Topológica)
VMD	Visual Molecular Dynamics (<i>Software</i>)
VS	<i>Virtual Screening</i> (Triagem Virtual)

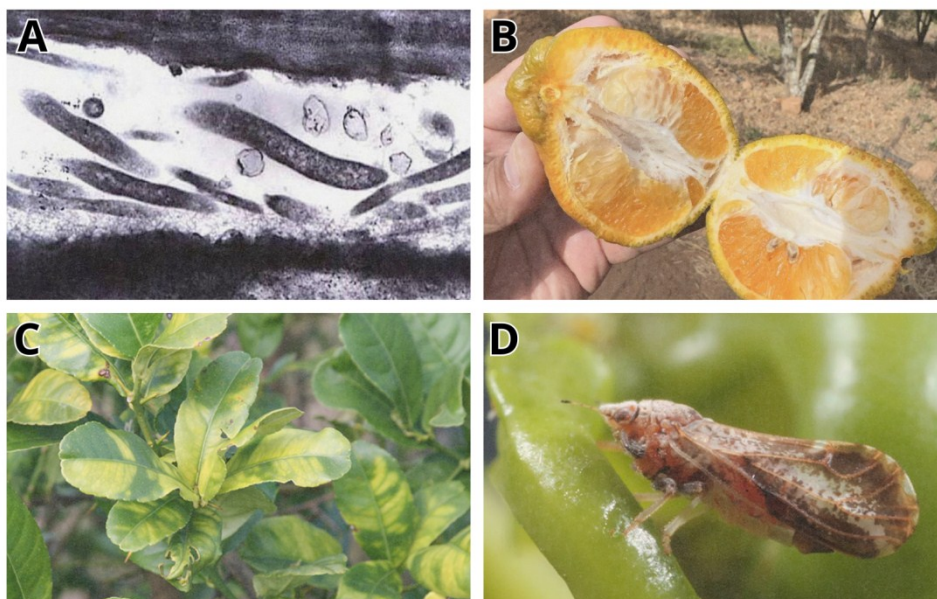
SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
2.1 O Problema Global: A Pandemia Huanglongbing (HLB)	5
2.1.1 Etiologia e Impacto do HLB	5
2.1.2 Estratégias de Controle Atuais e suas Limitações	6
2.2 O Alvo Molecular: A Proteína CLasTcyA e a Vulnerabilidade Metabólica	6
2.2.1 Biologia do <i>Candidatus Liberibacter asiaticus</i>	6
2.2.2 A Subunidade TcyA e o Metabolismo da Cistina	7
2.2.3 Justificativa Estrutural do Alvo	8
2.2.4 Dinâmica de Ligação e Seletividade dos Inibidores	9
2.3 Design de Fármacos Assistido por Computador: Fundamentos e Aplicações	10
2.3.1 Fundamentos de Química Medicinal e Triagem Virtual	10
2.3.2 Modelagem Farmacofórica e <i>Docking Molecular</i>	11
2.3.3 Simulações de Dinâmica Molecular (DM) e Validação de Estabilidade	11
2.3.4 Avaliação das Propriedades ADMET	12
3. OBJETIVOS	13
3.1 Objetivo Geral	13
3.2 Objetivos Específicos	13
4. PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS	14
4.1 Obtenção e Preparação do Alvo Molecular	15
4.2 Seleção das Bibliotecas de Compostos e Triagem Virtual	15
4.3 <i>Docking Molecular</i>	16
4.4 Simulações de Dinâmica Molecular (DM)	17
4.5 Avaliação das Propriedades ADMET	19
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	21
5.1. Estabilidade Dinâmica e Equilíbrio Conformacional (RMSD)	21
5.2. Flutuação Residual e Rigidez do Sítio Ativo (RMSF)	24
5.3. Análise da Rede de Ligações de Hidrogênio (<i>H-bond</i>)	26
5.4. Termodinâmica e Energias de Interação (Energy)	29
5.5. Exploração do Espaço Conformacional (PCA)	33
5.6. Perfil ADMET e Viabilidade Sistêmica em Citros	37
6. CONCLUSÃO	40
7. REFERÊNCIAS	41

1. INTRODUÇÃO

A *huanglongbing* (HLB), também conhecida como *greening*, é considerada a doença mais devastadora da citricultura na atualidade, provocando prejuízos severos globalmente (Ghosh et al., 2023). Essa doença é resultado da infecção causada pelo fitopatógeno bacteriano conhecido como *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLas), um microrganismo putativo que coloniza o floema da planta. Seu principal agente de transmissão é o inseto vetor *Diaphorina citri*, um psíldeo de grande prevalência em todas as principais regiões produtoras de citros (Silva et al., 2024). A seguir, ilustro esse panorama na Figura 1.

Figura 1 – Panorama biológico e agrônômico do *huanglongbing* (HLB). Em (A), o agente etiológico *Candidatus Liberibacter asiaticus*. Em (B), impactos macroscópicos e deformação no fruto. Em (C), sintomas foliares característicos de mosqueado assimétrico. Em (D), o inseto vetor *Diaphorina citri*.

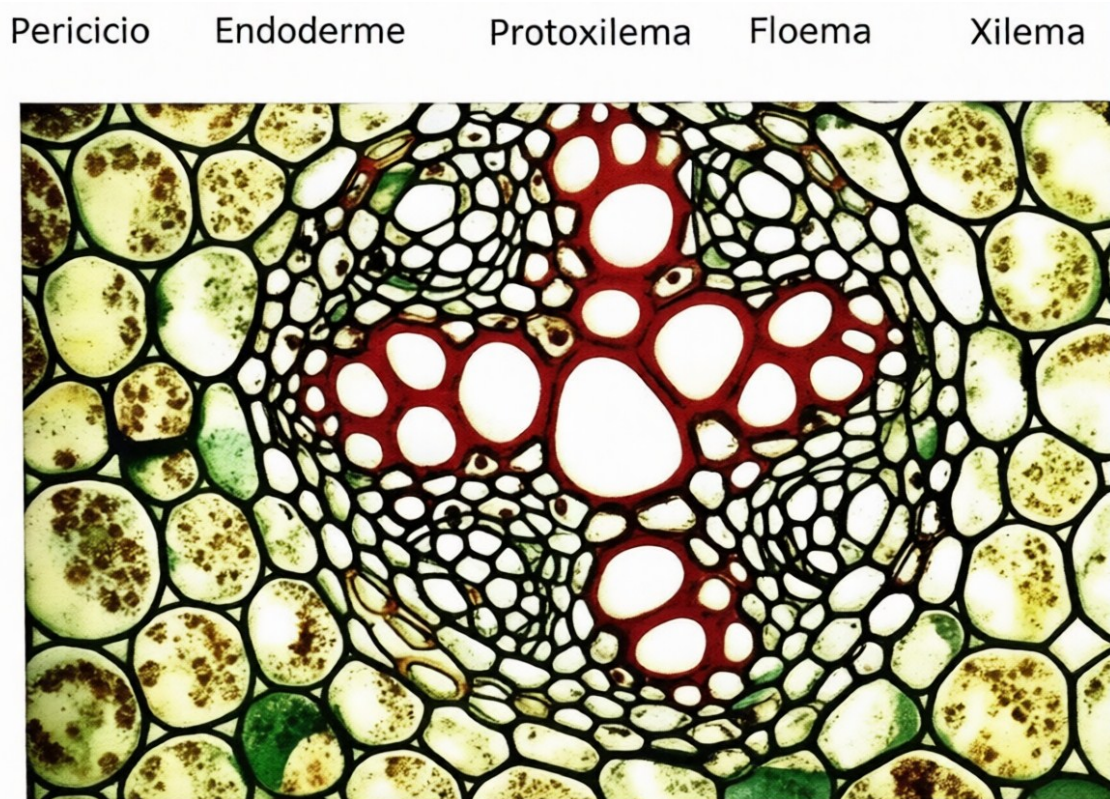


Fonte: Adaptado de Cultivar (2025), Agrodefesa (2024), A Nova Agricultura (2023) e Coleagro (2024).

Nesse contexto, a urgência em buscar soluções eficientes reside no expressivo impacto econômico e social que essa patologia impõe a países como o Brasil, um dos maiores produtores mundiais de *Citrus spp.* (Villar-Luna et al., 2024). Atualmente, o manejo do HLB no Brasil baseia-se no plantio preventivo de mudas certificadas, na erradicação compulsória de árvores sintomáticas e na aplicação massiva de inseticidas para conter o inseto vetor (Ghosh et al., 2023). Paralelamente, outros polos citrícolas globais recorreram ao uso de antibióticos. Contudo, essas abordagens têm demonstrado

eficácia limitada e gerado preocupações críticas relacionadas ao risco de seleção de resistência e contaminação ambiental (Batuman et al., 2024). A soma da perda constante de plantas produtivas com a dependência extrema de defensivos configura um modelo de manejo ecologicamente e economicamente insustentável. Além disso, a dificuldade de erradicação é agravada pelo fato de o CLas colonizar e se abrigar exclusivamente nos vasos do floema, uma fortaleza anatômica vegetal que restringe severamente a eficácia de agroquímicos convencionais (Figura 2).

Figura 2 – Morfoanatomia do cilindro vascular vegetal, evidenciando os vasos do floema, local de colonização estrita e proliferação do fitopatógeno *Candidatus Liberibacter asiaticus*.



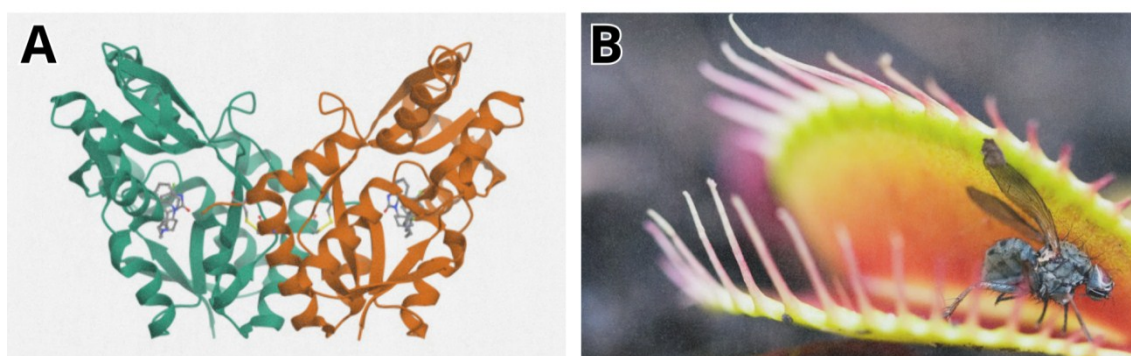
Fonte: Adaptado de Morfoanatomia Vegetal (2024).

Para contornar essas limitações de acesso e o risco de resistência terapêutica, o foco de novas abordagens consiste na inibição específica de proteínas vitais para o metabolismo do CLas. Assim, uma das alternativas mais promissoras é o bloqueio do transportador periplasmático de ligação a aminoácidos da família ABC, mais especificamente a subunidade de ligação ao substrato de alta afinidade de um sistema transportador de cistina (TcyA). A obtenção da estrutura cristalina da TcyA (PDB: 8GU1) forneceu os *insights* moleculares necessários, comprovando que o transportador

é um ponto de estrangulamento metabólico e, portanto, um alvo estratégico e relevante para o *design* de inibidores (Lonare et al., 2023).

A CLasTcyA atua como o canal de captação primário para a cistina, um aminoácido essencial para a fisiologia da bactéria (Kumar et al., 2019). Ademais, a cistina é precursora da glutatona, sendo esta crucial como agente redutor, protegendo o CLas contra o intenso estresse oxidativo induzido pela resposta imune do hospedeiro (Ma et al., 2022). Estruturalmente, a captação desse nutriente ocorre por meio do fechamento de dois domínios globulares sobre o ligante, um mecanismo biofísico conhecido como *Venus Flytrap*, em uma analogia direta ao movimento de captura de presas pelas plantas carnívoras (Kumar et al., 2019), conforme ilustra a Figura 3.

Figura 3 – Estrutura quaternária da proteína transportadora TcyA (A) e sua analogia com o mecanismo de fechamento *Venus Flytrap* (B), utilizado para a captação de cistina.



Fonte: Adaptado de RCSB Protein Data Bank (2026) e Superinteressante (2024).

A exploração da TcyA como alvo terapêutico ganha destaque devido à sua localização periplasmática, o que facilita o acesso de pequenas moléculas inibidoras sem a necessidade de transpor a complexa barreira da membrana citoplasmática bacteriana (Kumar et al., 2019). Diferentemente de alvos metabólicos intracelulares comuns, o bloqueio de um transportador de alta afinidade interrompe o influxo de nutrientes essenciais de maneira precoce, induzindo um estado de privação nutricional que compromete a viabilidade do patógeno em condições de baixa disponibilidade de solutos no floema (Lonare et al., 2023).

Ressalta-se que a pesquisa de inibidores eficazes é dificultada pelo fato de o CLas ser um microrganismo fastidioso e não cultivável em meios de cultura definidos, o que limita as abordagens experimentais de triagem *in vitro* e *in planta* (Irigoyen et al.,

2020). Essa limitação impulsiona a necessidade de metodologias rápidas e de alto rendimento, sendo a química computacional (*in silico*) a ferramenta adequada. O *design* de fármacos assistido por computador, que inclui modelagem farmacofórica, *docking molecular* e simulações de dinâmica molecular, permite a identificação e a otimização racional de moléculas ativas, utilizando a informação estrutural da TcyA.

Para viabilizar a descoberta de moléculas com tal potencial inibitório, a diversidade química das bibliotecas exploradas desempenha um papel fundamental. O uso de bases de dados como a NuBBE permite a investigação de produtos naturais da biodiversidade brasileira, que historicamente oferecem andaimes moleculares (*scaffolds*) complexos e favoráveis para a interação com proteínas (Valli et al., 2013). Essa abordagem é complementada pela biblioteca MolPort, que providencia uma vasta gama de compostos sintéticos com viabilidade comercial imediata, acelerando a transição de estudos teóricos para ensaios experimentais futuros.

Além da afinidade de ligação, a viabilidade técnica de um composto depende de sua capacidade de manter um perfil de estabilidade persistente sob as flutuações térmicas inerentes ao ambiente celular (Verli, 2014). Do mesmo modo, a triagem virtual exige a avaliação de propriedades farmacocinéticas e toxicológicas (ADMET), procedimento que legitima a molécula como potencial bioativo, conforme os parâmetros estabelecidos pelo *Assay Guidance Manual* (Markossian et al., 2004).

Para atender a essas exigências, o presente trabalho estruturou-se na aplicação de um *pipeline* computacional sequencial e integrativo. Inicialmente, realizou-se a triagem virtual de alto rendimento (HTVS) combinada ao *docking molecular* para filtrar as moléculas com maior afinidade teórica pelo sítio ativo. Em seguida, os complexos mais promissores foram submetidos a simulações de dinâmica molecular para avaliar a estabilidade conformacional e termodinâmica em um ambiente solvatado ao longo do tempo. Por fim, a predição do perfil ADMET atuou como um crivo ecotoxicológico, assegurando que os compostos selecionados não apenas inibam a TcyA de forma estável, mas também apresentem a segurança e a viabilidade técnica necessárias para o desenvolvimento de futuros defensivos agrícolas sistêmicos.

Diante da urgência imposta pelo HLB e da inacessibilidade do patógeno, a integração estratégica dessas bibliotecas químicas com ferramentas de triagem virtual e predições toxicológicas culmina na proposta central do presente estudo: a identificação racional de bioprodutos promissores capazes de neutralizar essa ameaça agrícola diretamente em seu alvo molecular.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 O Problema Global: A Pandemia Huanglongbing (HLB)

2.1.1 Etiologia e Impacto do HLB

O *huanglongbing* (HLB), ou *greening* dos citros, é universalmente classificado como a maior e mais devastadora ameaça fitossanitária à citricultura, dada a sua rápida expansão intercontinental e a incurabilidade da doença em campo (Ghosh et al., 2023). Diferentemente de outras fitopatologias, o HLB é caracterizado por uma etiologia intrincada e multifatorial. Esse patossistema complexo envolve a interação altamente específica de um vetor persistente e eficiente na transmissão, o psíldeo *Diaphorina citri*, com um patógeno intracelular restrito ao floema, a bactéria fastidiosa *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLas) (Silva et al., 2024).

O CLas, que não é cultivável em meio de cultura axênico, coloniza os vasos do floema, levando a uma interrupção sistêmica do transporte de nutrientes e açúcares, o que resulta nos sintomas clássicos de amarelecimento, mosqueamento foliar e queda prematura dos frutos (Kumar et al., 2019). Esta dinâmica de infecção e colonização do floema é o primeiro fator limitante para o manejo e tratamento da doença (Irigoyen et al., 2020), sendo crucial entender os mecanismos de defesa e virulência do CLas, especialmente aqueles envolvidos na resposta ao estresse oxidativo do hospedeiro, para desenvolver uma terapia eficaz.

A gravidade do HLB transcende as barreiras fitopatológicas, transformando-se em uma crise socioeconômica global. Países como o Brasil, que detêm a maior produção mundial de citros, e o México, um importante exportador, enfrentam prejuízos econômicos anuais na ordem de bilhões de dólares devido à erradicação de pomares, queda na produtividade e custos com o controle do vetor (Villar-Luna et al., 2024). O impacto social se manifesta na perda de empregos e na instabilidade de pequenas e médias propriedades rurais. Conforme apontado por Ghosh et al. (2023), a ausência de uma cura efetiva ou de variedades resistentes comercialmente viáveis solidifica a urgência em desvendar as vulnerabilidades metabólicas do CLas como principal estratégia para a sobrevivência da indústria cítrica.

2.1.2 Estratégias de Controle Atuais e suas Limitações

As estratégias de manejo e controle do HLB concentram-se atualmente em dois pilares: a erradicação imediata das plantas sintomáticas e o controle químico do vetor, *Diaphorina citri* (Ghosh et al., 2023). Contudo, a base do tratamento direto contra o patógeno CLas ainda reside majoritariamente no uso de antibióticos, como a oxitetraciclina e a estreptomicina. Embora estes compostos exibam eficácia temporária no controle da população bacteriana, sua aplicação tem se mostrado insustentável em longo prazo por três razões críticas (Batuman et al., 2024).

Primeiramente, a entrega dos antibióticos é dificultada pela restrição do CLas ao floema, o que exige métodos de injeção no tronco com eficácia variável. Em segundo lugar, o uso generalizado e preventivo de antibióticos na agricultura representa um risco significativo para a saúde pública e para o meio ambiente, aumentando a pressão seletiva para o desenvolvimento de resistência em outras populações bacterianas (Batuman et al., 2024). A própria União Europeia e outras jurisdições têm imposto restrições ao uso desses compostos na produção de alimentos, reforçando o dilema do setor citrícola (Ghosh et al., 2023).

Adicionalmente, as abordagens focadas no controle do vetor, embora essenciais para a redução da disseminação, são custosas e dependem de inspeções constantes e uso intensivo de inseticidas. Embora novas pesquisas explorem formulações avançadas, como inseticidas à base de quitosana (Mohan et al., 2024), o controle total do *D. citri* em vastos pomares é inviável (Silva et al., 2024). Dessa forma, a limitação de terapias sustentáveis e eficazes, especialmente pela natureza não cultivável do CLas, impulsiona a necessidade de abordagens de alto rendimento e de precisão molecular para a descoberta de inibidores que neutralizem pontos vulneráveis do metabolismo do patógeno.

2.2 O Alvo Molecular: A Proteína CLasTcyA e a Vulnerabilidade Metabólica

2.2.1 Biologia do *Candidatus Liberibacter asiaticus*

O *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLas) é o principal agente etiológico do HLB, pertencente ao filo *Proteobacteria* (Madigan et al., 2015). Sua classificação como

bactéria fastidiosa e, notavelmente, como parasita obrigatório do floema, é o principal desafio para o desenvolvimento de terapias (Irigoyen et al., 2020). Por ser um organismo não cultivável *in vitro* e por depender inteiramente da planta hospedeira para sobreviver, o CLas possui um genoma reduzido e carece de muitas vias biossintéticas essenciais encontradas em bactérias de vida livre.

Essa dependência extrema significa que o CLas precisa importar ativamente aminoácidos e nutrientes do citoplasma da célula hospedeira através de sua membrana celular. Para executar essa tarefa vital, o patógeno utiliza uma vasta coleção de transportadores de membrana. Estes sistemas de importação, especialmente os Transportadores ABC (*ATP-binding cassette proteins*), representam pontos críticos de vulnerabilidade metabólica que podem ser explorados para o desenvolvimento racional de inibidores (Kumar et al., 2019). É neste contexto de dependência e transporte que reside a justificativa para a escolha da proteína CLasTcyA como alvo de estudo.

2.2.2 A Subunidade TcyA e o Metabolismo da Cistina

Dentre os diversos transportadores ABC que o CLas utiliza para capturar nutrientes, a proteína de ligação à cistina (*cystine-binding protein*), denominada CLasTcyA, assume papel de destaque como um alvo de alta prioridade terapêutica (Lonare et al., 2023). A CLasTcyA é a subunidade periplasmática de alta afinidade que é responsável pela captação da cistina (o dímero do aminoácido cisteína). Este dímero é essencial, pois, uma vez importado para o citoplasma bacteriano e reduzido a cisteína, ele é convertido em glutatona (Ma et al., 2022).

A glutatona é uma das moléculas antioxidantes mais importantes, sendo fundamental para o CLas se proteger do estresse oxidativo induzido pela planta hospedeira. A ação do CLas desencadeia no hospedeiro uma resposta de defesa que inclui a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Essa resposta de defesa leva à produção excessiva de calose (um polissacarídeo) e a consequente deposição nas placas crivadas do floema (Ma et al., 2022). O bloqueio físico desses vasos, embora seja uma tentativa de isolamento da infecção, é o que, paradoxalmente, causa a interrupção sistêmica do transporte de fotoassimilados e manifesta os sintomas graves da doença, como o amarelecimento.

Assim, o CLas possui alta demanda por cistina (via CLasTcyA) para sintetizar glutathione e neutralizar a atividade oxidativa da planta. Ademais, estudos têm demonstrado que a CLasTcyA possui uma notável "flexibilidade" de ligação, podendo transportar outros substratos de interesse, o que aumenta o potencial de um inibidor ter um impacto amplo na sobrevivência do fitopatógeno (Kumar et al., 2019). Ao inibir a TcyA, interrompe-se o suprimento de cistina e, consequentemente, a defesa antioxidante da bactéria, tornando-a vulnerável aos mecanismos de defesa do hospedeiro. Portanto, esta estratégia de bloqueio de um ponto de estrangulamento metabólico justifica a triagem virtual de inibidores contra a CLasTcyA.

2.2.3 Justificativa Estrutural do Alvo

O sucesso de qualquer abordagem de design de fármacos racional (*structure-based drug design*) depende crucialmente da disponibilidade de uma estrutura tridimensional (3D) de alta resolução do alvo proteico (Leach, 2001). No contexto da CLasTcyA, a obtenção da estrutura por cristalografia de raios x representa um avanço fundamental que justifica a triagem virtual.

A estrutura da CLasTcyA, em sua conformação de ligação com o substrato e outros ligantes, foi determinada e depositada no Protein Data Bank (PDB) sob o código 8GU1 (Lonare et al., 2023). Esta estrutura cristalina de alta qualidade, que apresenta a proteína em complexo com o substrato cistina, é indispensável porque fornece o mapeamento atômico do sítio ativo (ou sítio de ligação), confirmando o dobramento da proteína como um típico transportador ABC (Kumar et al., 2019).

A resolução atômica da estrutura 8GU1 permite a definição precisa da geometria e das propriedades físico-químicas do sítio de ligação, incluindo a identificação dos resíduos de aminoácidos responsáveis pelas interações cruciais com o substrato. Esta informação estrutural detalhada é o pilar fundamental para as etapas subsequentes da metodologia *in silico*: ela viabiliza a construção de um modelo farmacofórico e orienta o processo de *docking molecular*, atuando como um gabarito para o desenho e a otimização de novos ligantes. A existência dessa estrutura de alta qualidade transforma o alvo CLasTcyA em um alvo adequado para a busca de inibidores por métodos computacionais.

Nesse cenário, estudos de triagem virtual de alto rendimento utilizando a estrutura 8GU1 identificaram que moléculas como a pimozida e o clidínio possuem alta afinidade por esse sítio, apresentando constantes de dissociação (K_D) na faixa micromolar e demonstrando eficácia na redução da carga bacteriana de CLas em ensaios experimentais (Lonare et al., 2023). Contudo, a aplicação direta de fármacos de uso humano na citricultura é limitada devido a preocupações ambientais, além do risco de resistência cruzada. Assim, a pimozida assume o papel de um gabarito estrutural ideal; ao mimetizar suas interações com resíduos chave do sítio ativo, como Val58, Leu61, Ile62, Asn75, Val76, Ala77, Arg82, His95, Gly124, Thr125, Asp126, e Leu127, é possível prospectar análogos bioativos que ofereçam uma alternativa de controle mais sustentável e específica para o HLB (Kumar et al., 2019; Lonare et al., 2023).

2.2.4 Dinâmica de Ligação e Seletividade dos Inibidores

A eficácia dos inibidores análogos à pimozida reside na capacidade de ocupar a fenda de ligação da TcyA, impedindo fisicamente a entrada da cistina no citoplasma bacteriano. A estrutura da CLasTcyA é composta por dois domínios globulares que se fecham sobre o ligante, mecanismo conhecido como *Venus Flytrap* (Kumar et al., 2019). Dito isso, inibidores volumosos e com características farmacofóricas específicas conseguem travar a proteína em uma conformação fechada ou impedir o fechamento completo, interrompendo o fluxo metabólico.

Além disso, a busca por análogos visa explorar a seletividade. Embora os transportadores ABC sejam universais, a arquitetura do sítio de ligação da TcyA em CLas apresenta particularidades estruturais que permitem o design de moléculas que não interfiram em transportadores de organismos benéficos ou no próprio hospedeiro (Kumar et al., 2019). Essa especificidade pode beneficiar a prospecção, via triagem virtual, resultando em compostos com alta eficiência e com um potencial baixo impacto colateral (Lonare et al., 2023).

Consequentemente, o desenvolvimento de inibidores estritamente seletivos atende a um dos maiores requisitos da biotecnologia agrícola contemporânea: a formulação de bioprodutos direcionados. Essa precisão molecular resguarda a microbiota benéfica e a fauna de polinizadores, alinhando a inovação química aos princípios de um manejo fitossanitário verdadeiramente sustentável.

2.3 Design de Fármacos Assistido por Computador: Fundamentos e Aplicações

2.3.1 Fundamentos de Química Medicinal e Triagem Virtual

A química medicinal é uma ciência interdisciplinar que se dedica ao design, síntese e desenvolvimento de novos agentes terapêuticos. Seu principal objetivo é identificar e otimizar compostos bioativos que possam interagir com alvos moleculares específicos, como a CLasTcyA, para modular uma função biológica e, assim, tratar uma doença (Patrick, 2023; Roche et al., 2020). A aplicação direta destes conceitos tem se mostrado essencial na recente prospecção e mapeamento de moléculas com ação bactericida voltadas especificamente ao combate da *Candidatus Liberibacter asiaticus* (Aksenov et al., 2024).

Tradicionalmente, o processo de descoberta de fármacos é longo, custoso e ineficiente, baseado em métodos experimentais de alto rendimento (*high-throughput screening* – HTS) que testam milhões de compostos em laboratório. Em contraste, o avanço da química computacional e da bioinformática estrutural permitiu o desenvolvimento da triagem virtual (*Virtual Screening* – VS).

A triagem virtual é uma abordagem de design de fármacos assistido por computador (CADD) que utiliza métodos computacionais para examinar vastas bibliotecas de moléculas (*in silico*), identificando aquelas com maior probabilidade de se ligar ao alvo proteico. Este método oferece vantagens substanciais, como a redução drástica de tempo e custos, mostrando-se adequada para a prospecção rápida de inibidores contra patógenos como o CLas, cuja natureza não cultivável restringe a triagem experimental tradicional (Verli, 2014; Leach, 2001). A VS pode ser dividida em duas estratégias principais:

1. **Triagem Baseada em Estrutura (*Structure-Based VS*):** Utiliza a estrutura 3D do alvo (como a 8GU1 da CLasTcyA) para realizar o *docking molecular* e prever as afinidades de ligação.
2. **Triagem Baseada em Ligante (*Ligand-Based VS*):** Utiliza as informações de moléculas já conhecidas (ligantes) para criar modelos de requisitos espaciais e físico-químicos (farmacóforos).

2.3.2 Modelagem Farmacofórica e *Docking Molecular*

A Triagem Virtual no presente trabalho combina as abordagens baseadas em ligante e em estrutura, iniciando com a modelagem farmacofórica. O farmacóforo é o arranjo espacial e eletrônico de características essenciais (como aceitadores e doadores de ligação de hidrogênio, ou grupos hidrofóbicos) que uma molécula precisa possuir para interagir com o sítio ativo de um alvo (Leach, 2001). A criação de um modelo farmacofórico, tipicamente realizada em plataformas como o Molecular Operating Environment (MOE) (Jain et al., 2018), permite a triagem de grandes bases de dados de compostos, filtrando-os com base na similaridade com o ligante natural da CLasTcyA (cistina) ou com outros ligantes conhecidos, aumentando significativamente a taxa de acerto na busca por novos inibidores.

As moléculas que passam pela triagem farmacofórica são, subsequentemente, submetidas ao *docking molecular*. O *docking molecular* é uma técnica computacional que prediz a orientação preferencial de um ligante (molécula pequena) no sítio ativo da proteína (Lonare et al., 2023), como a CLasTcyA (PDB: 8GU1), e avalia a afinidade de ligação por meio de funções de escore. Essa afinidade é expressa em unidades como kcal/mol e permite classificar as moléculas candidatas com base na sua probabilidade de se ligarem de forma estável ao alvo. Embora o *docking* seja uma técnica estática (ou seja, avalia apenas o complexo em seu estado de menor energia), ele constitui uma etapa fundamental para a seleção dos principais candidatos que serão levados à etapa de Dinâmica Molecular, a fim de testar sua estabilidade em um ambiente mais próximo do biológico.

2.3.3 Simulações de Dinâmica Molecular (DM) e Validação de Estabilidade

Conforme mencionado, o *docking molecular* fornece uma representação estática do modo de ligação. Para simular as condições biológicas reais, que envolvem flutuações de energia térmica e a presença do solvente (água), utiliza-se a dinâmica molecular (DM). A DM é uma simulação que aplica as leis da física clássica (leis de Newton) para calcular a trajetória temporal de cada átomo no sistema (proteína, ligante e solvente) (Verli, 2014).

O sistema é descrito por um campo de força, um conjunto de equações e parâmetros que governam as interações entre os átomos. A parametrização correta tanto da proteína (via CHARMM27, por exemplo) quanto do ligante é crítica para a precisão da simulação, sendo este último frequentemente gerado por ferramentas como o SwissParam (Zoete et al., 2011).

A DM é executada em *softwares* especializados de alto desempenho, como o GROMACS (Van der Spoel et al., 2012). O principal objetivo da DM, na presente pesquisa, consiste em validar a estabilidade e a integridade dos complexos proteína-ligante selecionados pelo *docking*. Parâmetros como o desvio quadrático médio (RMSD ou *Root-Mean-Square Deviation*) são analisados para confirmar se o ligante permanece estável no sítio ativo ao longo de dezenas ou centenas de nanossegundos, fornecendo um crivo de validação rigoroso para os inibidores mais promissores.

2.3.4 Avaliação das Propriedades ADMET

Mesmo após as etapas de *docking* e dinâmica molecular, um candidato a inibidor pode ser inviabilizado caso não possua características físico-químicas adequadas para se tornar um fármaco. A viabilidade técnica de um composto depende de sua capacidade de ser absorvido pelo organismo, distribuído para o local de ação, metabolizado e excretado, processo resumido pela sigla ADMET (*absorption, distribution, metabolism, excretion, and toxicity*) (Markossian et al., 2004).

A análise ADMET *in silico* permite filtrar precocemente os candidatos mais promissores, evitando a síntese laboratorial de moléculas que seriam rejeitadas em fases experimentais posteriores (*in vitro* e *in planta*). Dois dos filtros mais utilizados para prever a viabilidade sistêmica e a semelhança com fármacos são a Regra dos Cinco de Lipinski e os escores de toxicidade.

Ferramentas como o SwissADME (Daina et al., 2017) e o Deep-PK (Song et al., 2024) predizem as propriedades farmacocinéticas e toxicológicas dos ligantes. Essa triagem final assegura que os compostos previamente validados por *docking* e dinâmica molecular apresentem a segurança e a viabilidade técnica necessárias para justificar os ensaios *in vitro* e *in vivo*, finalizando a estratégia computacional.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Identificar moléculas com potencial inibidor contra a proteína alvo CLasTcyA do fitopatógeno *Candidatus Liberibacter asiaticus*, visando o controle do *huanglongbing* (HLB), por meio de abordagens *in silico* de modelagem molecular e bioinformática.

3.2 Objetivos Específicos

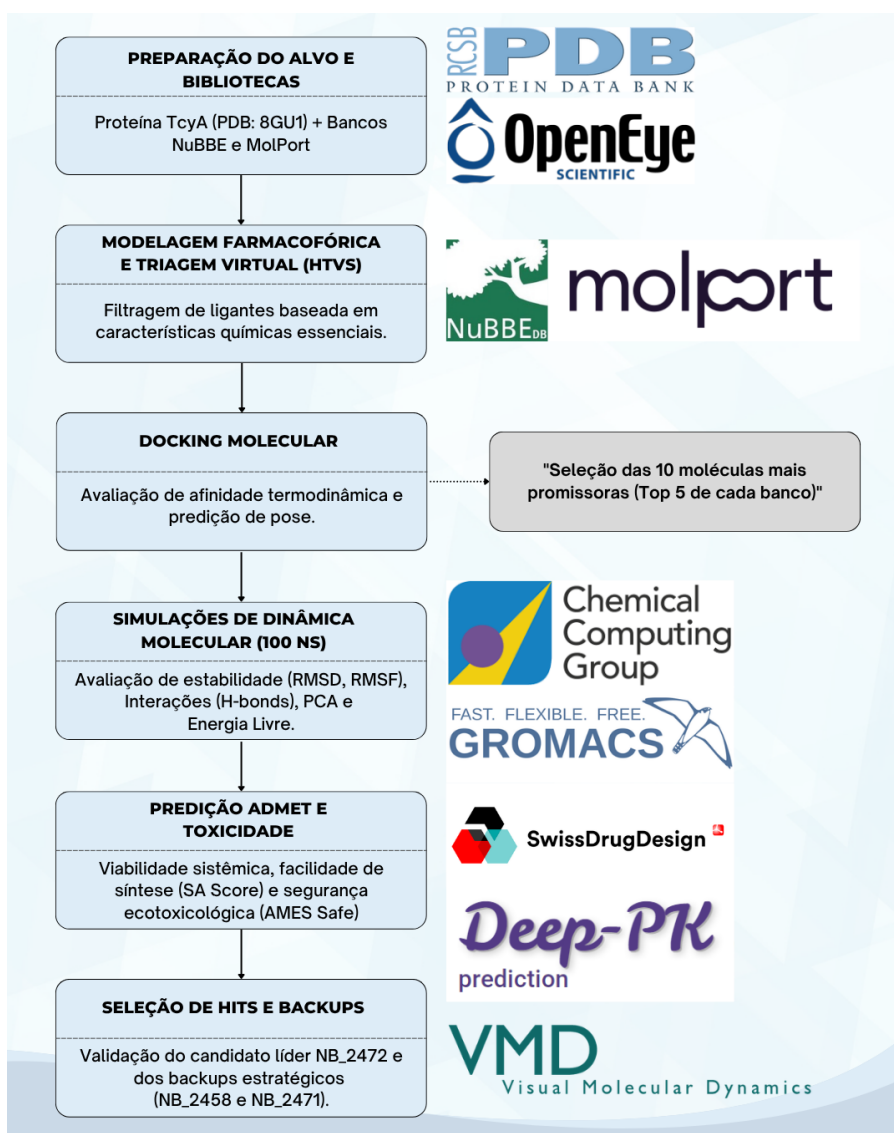
Para o alcance do objetivo geral, estabeleceram-se os seguintes objetivos específicos:

- a) Desenvolver um modelo farmacofórico baseado no ligante presente na estrutura cristalina (PDB: 8GU1) e realizar uma triagem virtual de alto rendimento (*Virtual Screening*) nos bancos de dados NuBBE e MolPort, para identificar os ligantes com maior afinidade pelo sítio ativo;
- b) Realizar o *docking molecular* das moléculas triadas e selecionar as dez candidatas com melhor desempenho (cinco representantes de cada banco de dados) com base na afinidade de ligação;
- c) Submeter as moléculas selecionadas a simulações de dinâmica molecular (DM) para avaliar a estabilidade e as interações do complexo inibidor-TcyA no ambiente molecular;
- d) Avaliar as propriedades ADMET (absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade) das dez moléculas candidatas, conforme os parâmetros estabelecidos para a descoberta de bioprodutos;
- e) Validar o protocolo de simulação utilizando o campo de força CHARMM27 na avaliação do complexo, com o uso de controles específicos, para consolidar a seleção do composto líder.

4. PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS

O presente estudo baseou-se em uma abordagem de química computacional estruturada em um funil de triagem virtual de alto rendimento (*High-Throughput Virtual Screening* - HTVS), com o objetivo de identificar e validar potenciais inibidores para a proteína CLasTcyA. O *pipeline* metodológico foi dividido em quatro etapas principais: modelagem farmacofórica, *docking molecular*, simulações de dinâmica molecular e predição de propriedades farmacocinéticas e toxicológicas (ADMET), conforme esquematizado na Figura 4.

Figura 4 – Fluxograma do *pipeline* metodológico aplicado no estudo *in silico*. O esquema ilustra as etapas sequenciais de triagem virtual, *docking molecular*, simulações de dinâmica molecular e predições ADMET para a identificação de inibidores da CLasTcyA.



Fonte: Elaborado pelo autor (2026).

4.1 Obtenção e Preparação do Alvo Molecular

A estrutura tridimensional da proteína transportadora de cistina, denominada CLasTcyA, foi obtida do banco de dados público Protein Data Bank (PDB), sob o código de identificação 8GU1. Esta estrutura foi determinada via cristalografia de raios X com uma resolução atômica de 2,65 Å, apresentando o receptor em complexo com o inibidor pimozida (Lonare et al., 2023).

A preparação do alvo foi conduzida no *software* Molecular Operating Environment (MOE) versão 2022.02 (Chemical Computing Group, 2022). Inicialmente, a estrutura cristalina depositada como um homodímero, foi processada para a obtenção de uma unidade monomérica funcional. O ligante co-cristalizado (pimozida) foi identificado e segregado do sítio ativo para permitir as etapas subsequentes de prospecção (Verli, 2014).

O processo de refinamento estrutural foi realizado por meio do protocolo *QuickPrep*. Esta etapa compreendeu a remoção de moléculas de água de cristalização, íons e solventes não biologicamente relevantes. Simultaneamente, realizou-se a correção de erros estruturais, incluindo a modelagem de cadeias laterais ausentes e o ajuste dos estados de protonação dos resíduos de aminoácidos em pH fisiológico (7,0) via módulo *Protonate 3D*. Para a adequada representação eletrostática do sistema, foram adicionados átomos de hidrogênio e aplicados campos de força específicos para estabilização das cargas parciais.

Por fim, o sítio ativo foi definido com base nas coordenadas dos resíduos que compõem a fenda de ligação, com ênfase nos resíduos conservados Val58, Leu61, Ile62, Asn75, Val76, Ala77, Arg82, His95, Gly124, Thr125, Asp126, e Leu127, descritos como fundamentais para a estabilização do receptor-ligante no mecanismo *Venus Flytrap* (Kumar et al., 2019; Lonare et al., 2023). Esta caracterização serviu como gabarito para a construção do modelo farmacofórico e os ensaios de *docking molecular*.

4.2 Seleção das Bibliotecas de Compostos e Triagem Virtual

A prospecção de potenciais inibidores para a CLasTcyA foi realizada a partir de duas bibliotecas de compostos com características complementares: a NuBBE Database, que reúne informações estruturais e bioatividade de produtos naturais da biodiversidade

brasileira (Valli et al., 2013), e a MolPort, uma base de dados comercial que oferece ampla diversidade química e viabilidade de aquisição para ensaios futuros. A preparação dessas bibliotecas foi conduzida utilizando os softwares da OpenEye Scientific (OpenEye Scientific Software, 2026a, 2026b). Inicialmente, os compostos foram submetidos ao *software* FILTER para a remoção de moléculas com propriedades físico-químicas indesejáveis ou alertas de toxicidade. Em seguida, o programa QUACPAC foi empregado para o cálculo de pKa, ajuste dos estados de tautomerização e atribuição de cargas precisas em pH fisiológico (7.4). Por fim, a geração das múltiplas conformações em 3D, etapa essencial para o sucesso da triagem virtual, foi conduzida por meio do *software* OMEGA.

A estratégia de triagem virtual foi estruturada em duas etapas sequenciais: filtro farmacofórico e *docking molecular*. O modelo farmacofórico foi construído com base nas interações observadas no complexo experimental CLasTcyA-Pimozida (PDB ID: 8GU1). Foram definidos pontos farmacofóricos essenciais, com ênfase na mimetização das interações com os resíduos Arg82 e Asp126, além de centros de densidade eletrônica correspondentes aos anéis aromáticos do ligante gabarito. Este modelo serviu como um crivo geométrico e eletrônico, no qual o desvio quadrático médio (RMSD de sobreposição) foi utilizado para reter apenas as moléculas capazes de satisfazer espacialmente os requisitos do sítio ativo (Leach, 2001).

4.3 Docking Molecular

As moléculas que apresentaram complementaridade ao modelo farmacofórico foram submetidas ao *docking molecular* no *software* MOE, visando prever a orientação preferencial e estimar a afinidade termodinâmica dos compostos. O sítio ativo foi definido com base nas coordenadas do ligante cristalográfico, e o algoritmo de posicionamento (*placement*) empregado foi o Triangle Matcher. Este método explorou a flexibilidade conformacional dos ligantes para o alinhamento aos pontos de interação do sítio ativo (*Induced Fit*), mantendo o receptor rígido nesta fase inicial, com a pontuação primária das poses realizada pela função de *scoring* London dG (Leach, 2001).

Após esse posicionamento, as poses passaram por um refinamento térmico (*Rigid Receptor*) e por uma reclassificação final utilizando a função GBVI/WSA dG. O critério definitivo de seleção baseou-se no *Score S*, uma estimativa da energia livre de

ligação (ΔG) que engloba os termos eletrostáticos, de solvatação e de *van der Waals*. Considerando que valores mais negativos indicam maior estabilidade teórica e provável atividade biológica, as interações das melhores poses foram analisadas visualmente para confirmar o cumprimento dos requisitos farmacofóricos, priorizando o contato estável com os resíduos-chave Arg82 e Asp126 (Chemical Computing Group, 2022).

A execução rigorosa desta etapa de *docking* atuou como um funil computacional crítico para reduzir o espaço químico. Ao avaliar a complementaridade estérico-eletrônica de milhares de conformações, o algoritmo descartou falsos positivos que satisfaziam apenas requisitos geométricos superficiais do modelo farmacofórico (Leach, 2001). Consequentemente, os recursos computacionais exigidos pelas simulações de dinâmica molecular foram direcionados exclusivamente às moléculas com viabilidade real de ancoragem e estabilidade no sítio ativo (Patrick, 2023).

Ao final do processo de pontuação e inspeção visual, foram selecionadas as cinco moléculas com os melhores resultados de cada biblioteca, compondo as 10 candidatas finais para as avaliações ADMET e simulações de dinâmica molecular (DM). Ressalta-se que a molécula original (pimozida), extraída do complexo experimental 8GU1, não passou por esta etapa de *docking*. Sua estrutura foi direcionada diretamente para as simulações de DM, atuando como um controle positivo para validar a estabilidade das interações em um ambiente que considera a flexibilidade total do sistema proteína-ligante.

4.4 Simulações de Dinâmica Molecular (DM)

As simulações de dinâmica molecular foram realizadas utilizando o *software* GROMACS versão 2021.4 (Van der Spoel et al., 2012), com o objetivo de minimizar choques estéricos e avaliar a estabilidade temporal dos complexos selecionados e do controle positivo (pimozida). Para a descrição das interações do sistema, empregou-se o campo de força CHARMM27.

Os parâmetros topológicos dos ligantes foram gerados via servidor SwissParam. Esta ferramenta utilizou o campo de força *Merck Molecular Force Field* (MMFF) para a atribuição de cargas e geração de arquivos de topologia específica (.itp), garantindo a compatibilidade com os parâmetros proteicos do CHARMM.

A montagem do sistema seguiu o protocolo de solvatação em caixa do tipo triclinica, com uma distância mínima de 1,0 nm entre a proteína e as bordas da caixa. Utilizou-se o modelo de água explícita TIP3P e o sistema foi neutralizado com a adição de íons Na^+ e Cl^- em uma concentração de 0,1 M. O protocolo de simulação compreendeu as seguintes etapas:

- 1. Minimização de Energia:** Realizada para aliviar choques estéricos até que a força máxima fosse inferior a 1000 kJ/mol/nm.
- 2. Equilíbrio:** Conduzido em duas fases de 100 ps cada; a primeira sob o ensemble NVT (número de partículas, volume e temperatura constantes) e a segunda sob o ensemble NPT (pressão constante), utilizando acoplamento de temperatura para estabilização térmica do sistema.
- 3. Produção (MD):** A trajetória de produção foi executada por 100 ns, utilizando um integrador de 2 fs e coordenadas salvas a cada 10 ps para análise posterior.

As trajetórias foram tratadas para correção de periodicidade (*PBC nojump*). Já a estabilidade termodinâmica foi verificada via cálculo do desvio quadrático médio (RMSD) e a flexibilidade residual pela flutuação quadrática média (RMSF). Adicionalmente, quantificou-se o número de ligações de hidrogênio (*H-bond*) entre proteína e ligante ao longo do tempo.

Para a análise da dinâmica essencial e movimentos de grande amplitude do receptor, realizou-se a Análise de Componentes Principais (PCA). Construiu-se a matriz de covariância dos átomos do *backbone*, seguida da diagonalização para obtenção dos autovetores e autovalores. As projeções dos movimentos essenciais foram geradas nos dois primeiros componentes principais (PC1 e PC2), permitindo a visualização do espaço conformacional explorado pelo complexo.

Finalmente, a energia livre de ligação foi estimada pelo método MM/PBSA (*Molecular Mechanics/Poisson-Boltzmann Surface Area*) utilizando a ferramenta gmx_MMPBSA (Valdés-Tresanco et al., 2021). O cálculo considerou as energias de *van der Waals*, eletrostática e as contribuições de solvatação (polar e apolar) para determinar a afinidade termodinâmica média dos complexos.

A visualização e inspeção das trajetórias foram conduzidas no *software* VMD (Humphrey et al., 1996) e os gráficos gerados no *software* Grace (Turner, 2005). Para o tratamento estatístico, realizou-se uma subamostragem (*subsampling*) processando-se os 10.000 *frames* para um conjunto reduzido de 100 pontos equidistantes.

4.5 Avaliação das Propriedades ADMET

Para determinar a viabilidade dos inibidores selecionados como potenciais candidatos a defensivos agrícolas (bioprodutos), foi realizada uma avaliação metódica de suas propriedades de Absorção, Distribuição, Metabolismo, Excreção e Toxicidade (ADMET). No contexto de patógenos vegetais, esta etapa é crucial para filtrar moléculas que possuam boa translocação sistêmica no floema, além de garantir a segurança ocupacional do aplicador e o baixo impacto ambiental. Ademais, as análises foram realizadas com enfoque em oito parâmetros específicos: coeficiente de partição (Log P), solubilidade aquosa (Log S), área de superfície polar topológica (TPSA), bloqueio do canal de potássio hERG, permeabilidade da barreira hematoencefálica (BEE/BHE), mutagenicidade (Teste de Ames), afinidade pela P-glicoproteína (P-gp) e acessibilidade sintética (SA) (Patrick, 2023; Markossian et al., 2004).

As análises de farmacocinética, solubilidade e semelhança com fármacos (*drug-likeness*) foram conduzidas utilizando a plataforma web SwissADME (Daina et al., 2017). Foram aplicados os filtros da Regra de Lipinski (Lipinski et al., 2001) (Peso Molecular ≤ 500 Da, $\log P \leq 5$, doadores de ligação H ≤ 5 e aceptadores de ligação H ≤ 10) para avaliar a viabilidade de absorção sistêmica. Adicionalmente, utilizou-se o modelo preditivo BOILED-Egg para verificar a permeabilidade gastrointestinal e a capacidade de penetração na barreira hematoencefálica (BHE), um parâmetro fundamental para atestar a segurança neurotoxicológica do trabalhador agrícola no campo (Daina et al., 2017).

Complementarmente, a predição de perfis metabólicos e toxicidade foi realizada por meio do servidor Deep-PK (Song et al., 2024), que utiliza algoritmos de *deep learning* para estimar parâmetros críticos. Nesta análise, priorizou-se a verificação de:

- **Toxicidade Aguda:** Avaliação de mutagenicidade (Teste de Ames) e hepatotoxicidade.

- **Metabolismo:** Interação com isoenzimas do Citocromo P450 (CYP), identificando potenciais inibidores ou substratos.
- **Excreção:** Estimativa da depuração renal total (*total clearance*).

A validação dos resultados foi conduzida por meio de uma análise comparativa multicritério, na qual a convergência dos dados de *docking* (*Score S*) foi cruzada com a estabilidade dinâmica observada nos gráficos de RMSD e a energia livre de ligação calculada pelo método MM/PBSA. Essa abordagem integrativa visa mitigar as limitações intrínsecas de cada algoritmo individualmente, assegurando que a seleção final dos candidatos não se baseie apenas em uma afinidade teórica pontual, mas em um perfil de permanência estável no sítio ativo sob condições dinâmicas simuladas.

Adicionalmente, todos os protocolos computacionais foram executados seguindo padrões de reprodutibilidade científica, com o registro rigoroso de sementes aleatórias (*random seeds*) e versões de softwares para permitir a auditabilidade do *pipeline* HTVS empregado. O tratamento estatístico das trajetórias de dinâmica molecular, envolvendo a subamostragem de frames e o cálculo de desvios médios, garantiu que as flutuações térmicas aleatórias não comprometessem a interpretação dos movimentos essenciais da proteína, consolidando a robustez dos modelos preditivos utilizados para a triagem dos novos bioativos.

A integração dessas ferramentas computacionais permitiu a identificação de compostos que apresentam perfis de segurança e propriedades farmacocinéticas promissores, em conformidade com os rigorosos critérios estabelecidos para o desenvolvimento de novos agroquímicos. A convergência entre a estabilidade termodinâmica observada no sítio ativo da CLasTcyA e a baixa toxicidade predita qualifica essas moléculas como candidatos viáveis para futuras etapas de validação experimental, seja por meio de ensaios de ligação *in vitro* ou testes de eficácia *in planta* contra o fitopatógeno.

Assim, este *pipeline* consolida a otimização racional de bioativos sistêmicos com eficiente translocação via floema. Frente à severa urgência agronômica do *huanglongbing* (HLB), a estratégia reduz significativamente o tempo e os custos de prospecção inicial, assegurando novos inibidores com o rigor estrutural e biológico exigido para superar a resistência e o estresse oxidativo inerentes à infecção bacteriana por CLas.

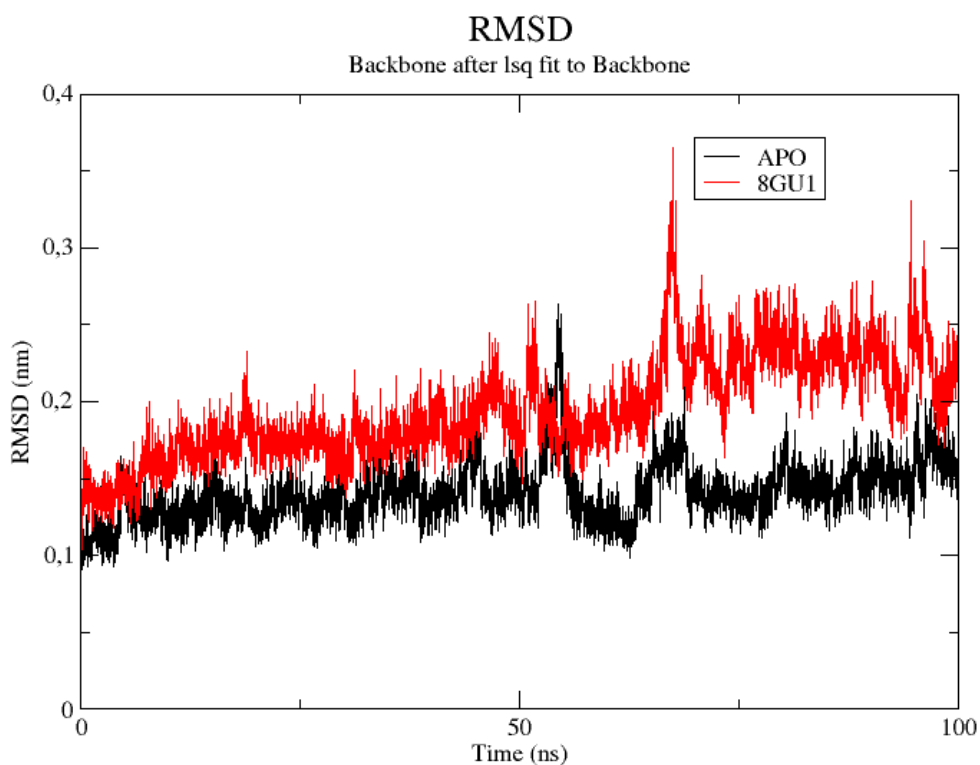
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Estabilidade Dinâmica e Equilíbrio Conformacional (RMSD)

A análise do desvio quadrático médio (RMSD – *root mean square deviation*) foi conduzida para avaliar a estabilidade estrutural do esqueleto carbônico (C-alpha) da proteína CLasTcyA e a convergência do sistema ao longo dos 100 ns de simulação de dinâmica molecular. A proteína em seu estado não ligante (APO) apresentou um RMSD médio de $0,14 \pm 0,02$ nm, evidenciando a integridade e a consistência do modelo tridimensional utilizado.

Para estabelecer um patamar biológico de comparação, a molécula de referência (8GU1) acoplada ao sítio ativo foi avaliada, resultando em um desvio médio de $0,19 \pm 0,03$ nm. Este valor denota uma estabilidade conformacional aceitável, servindo como limite superior tolerável (linha de base) para a triagem dos novos candidatos a inibidores (Figura 5).

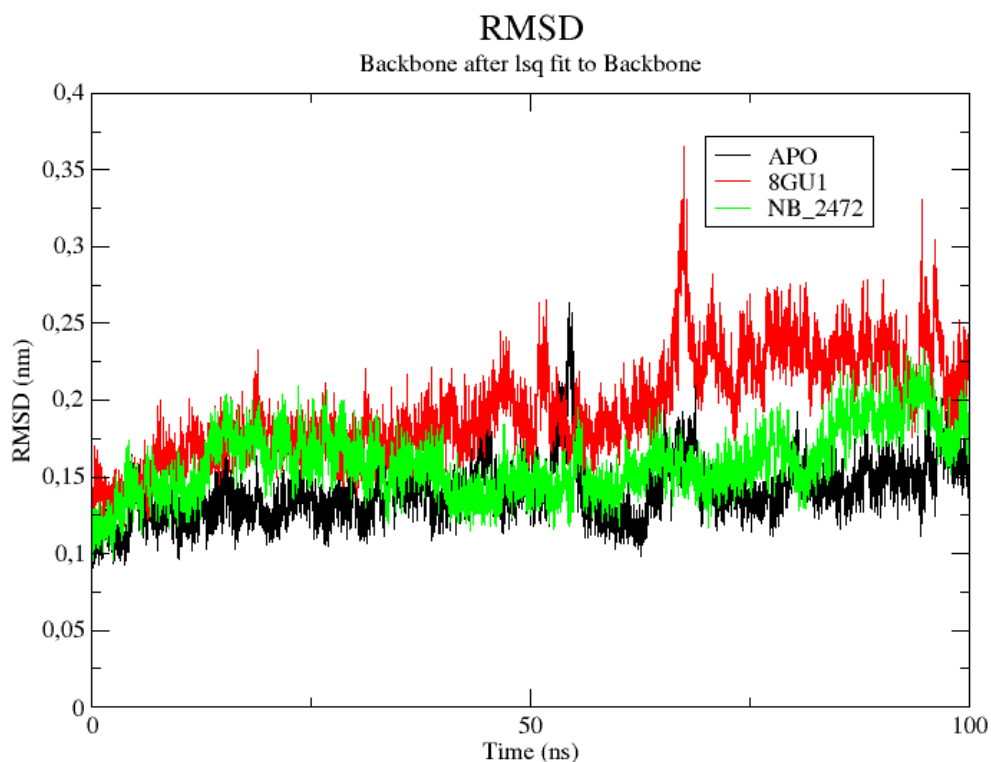
Figura 5 – Perfil de RMSD comparativo entre a proteína CLasTcyA livre (APO) e o complexo com o ligante de referência (8GU1).



Fonte: Elaborado pelo autor (2026).

Ao analisar o comportamento dos ligantes prospectados, observou-se que a maioria das moléculas foi capaz de manter a estabilidade do complexo em níveis superiores ou equivalentes à referência. Destacam-se os complexos formados pelos compostos naturais e semissintéticos, com destaque para o candidato NB_1261 ($0,15 \pm 0,01$ nm) e o NB_2472 ($0,16 \pm 0,02$ nm). A baixa flutuação e o reduzido desvio padrão destas moléculas indicam que, após o período inicial de relaxamento térmico, o sistema atingiu rapidamente um platô de equilíbrio duradouro, minimizando mudanças conformacionais abruptas na estrutura terciária do receptor (Figura 6).

Figura 6 – Estabilidade conformacional (RMSD) otimizada pelo candidato líder NB_2472 em comparação à referência (8GU1) e à enzima livre (APO).

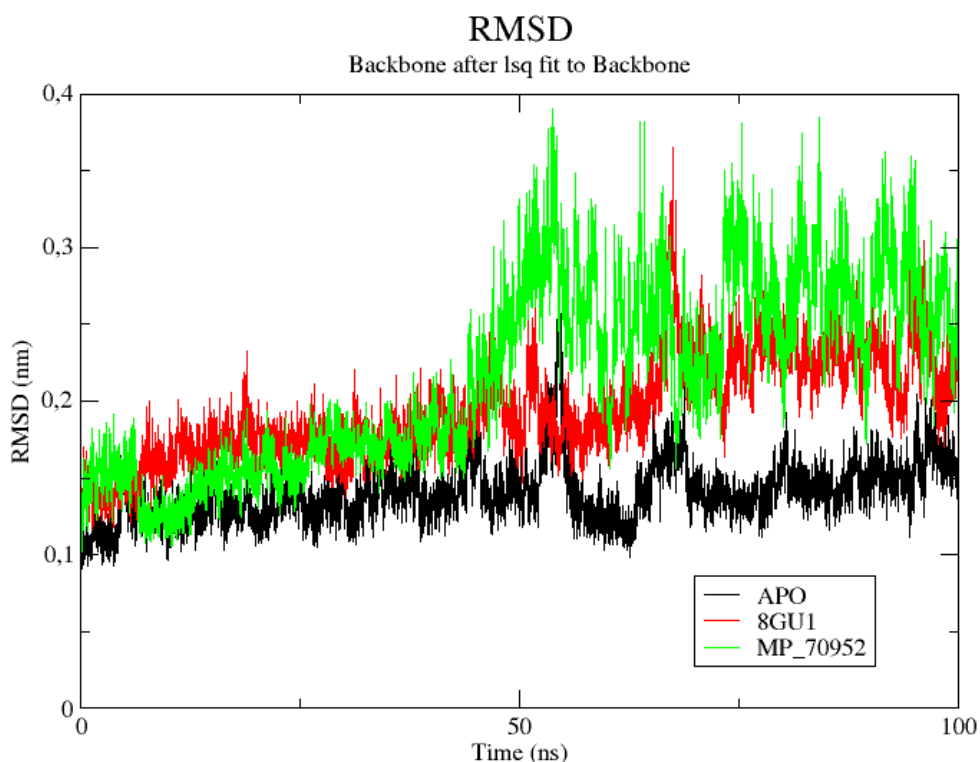


Fonte: Elaborado pelo autor (2026).

A molécula sintética MP_8547 também apresentou elevada estabilidade estrutural ($0,18 \pm 0,02$ nm), confirmando sua alta capacidade de ancoragem termodinâmica inicial, embora, conforme será discutido posteriormente, o perfil de estabilidade isolado não seja suficiente para validar o composto frente a filtros toxicológicos.

Em contrapartida, as análises revelaram candidatos que levaram a uma maior instabilidade estrutural da proteína, como a NB_2471 ($0,22 \pm 0,05$ nm) e a MP_70952 ($0,22 \pm 0,06$ nm). O aumento do desvio padrão e as maiores médias de RMSD sugerem uma adaptação contínua (ou instabilidade) do ligante dentro da fenda de ligação, o que corrobora a sua menor eficácia teórica na manutenção do complexo em comparação aos ligantes líderes do estudo (Figura 7).

Figura 7 – Demonstração da instabilidade conformacional (RMSD) induzida por ligantes de menor afinidade, como a MP_70952, evidenciando grandes oscilações estruturais.



Fonte: Elaborado pelo autor (2026).

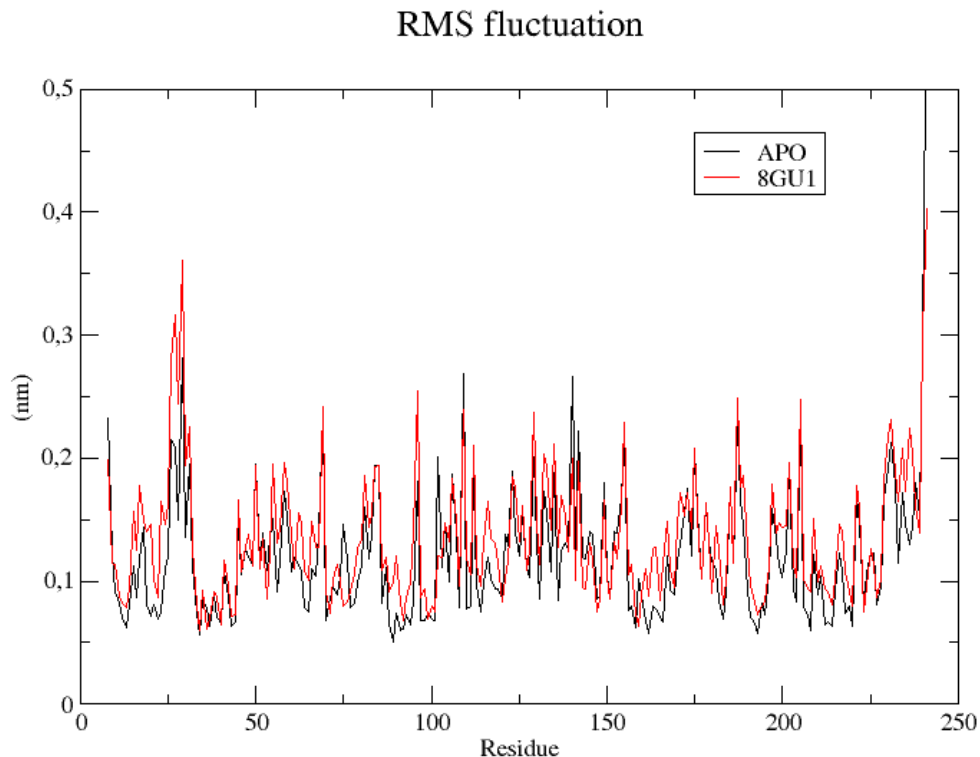
Estes resultados confirmam que as interações estabelecidas pelas moléculas mais bem ranqueadas foram suficientes para restringir a flexibilidade intrínseca da CLasTcyA, garantindo a permanência do ligante no sítio ativo. Esse travamento conformacional é crucial, pois impede fisicamente o movimento de fechamento necessário para a captação de nutrientes vitais pela bactéria, consolidando o potencial inibitório dos compostos. O refinamento desta estabilidade, focado especificamente nos resíduos de interação da fenda de ligação, é detalhado a seguir por meio da análise de flutuação residual.

5.2. Flutuação Residual e Rigidez do Sítio Ativo (RMSF)

Enquanto o RMSD avalia a estabilidade global do sistema, a flutuação quadrática média (RMSF – *root mean square fluctuation*) permite uma análise em nível de resíduo, identificando as regiões da proteína que apresentam maior mobilidade durante a trajetória. No contexto do planejamento de fármacos e bioprodutos, um inibidor eficaz deve ser capaz de ancorar-se firmemente à fenda de ligação, restringindo a flexibilidade dos resíduos de aminoácidos-chave e, conseqüentemente, suprimindo a atividade de transporte.

A proteína livre (APO) exibiu uma flutuação residual média no sítio ativo de $0,12 \pm 0,05$ nm. A introdução do ligante de referência (8GU1) elevou levemente essa flutuação para $0,14 \pm 0,05$ nm, sugerindo que, embora a molécula permaneça no sítio (como atestado pelo RMSD), ela permite um grau moderado de liberdade conformacional aos resíduos adjacentes (Figura 8).

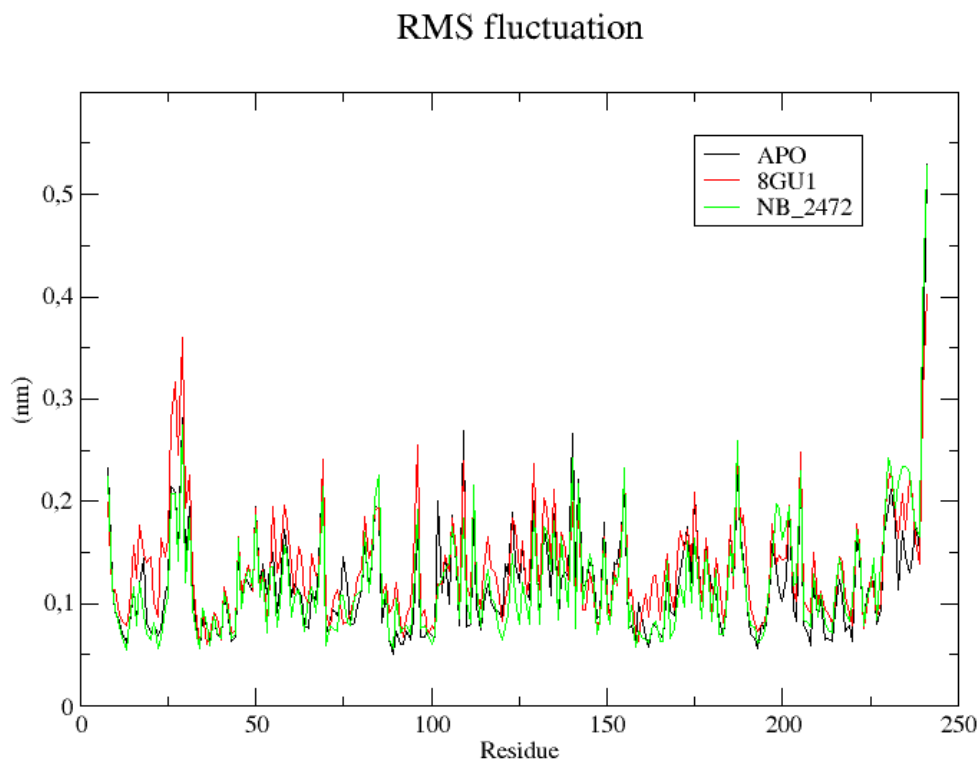
Figura 8 – Perfil de flutuação residual (RMSF) comparativo entre a proteína livre (APO) e o complexo com o ligante de referência (8GU1), estabelecendo a linha de base de mobilidade.



Fonte: Elaborado pelo autor (2026).

Contrastando com a referência, os melhores candidatos do estudo demonstraram uma capacidade superior de imobilização do sítio ativo. A molécula MP_8547 apresentou o menor índice de flutuação da triagem ($0,11 \pm 0,06$ nm), promovendo uma alta rigidez local. O candidato líder do estudo, a molécula semissintética NB_2472, assim como os compostos NB_1261 e NB_1260, registraram um RMSF de 0,12 nm. Este valor indica que tais ligantes conseguem potencialmente mimetizar o estado de compactação intrínseco da proteína livre, bloqueando a flexibilidade dinâmica necessária para a captação do ligante natural da CLasTcyA (Figura 9).

Figura 9 – Restrição de mobilidade e silenciamento conformacional do sítio ativo, promovidos pela interação com o candidato líder NB_2472, em comparação à referência (8GU1) e à proteína livre (APO).

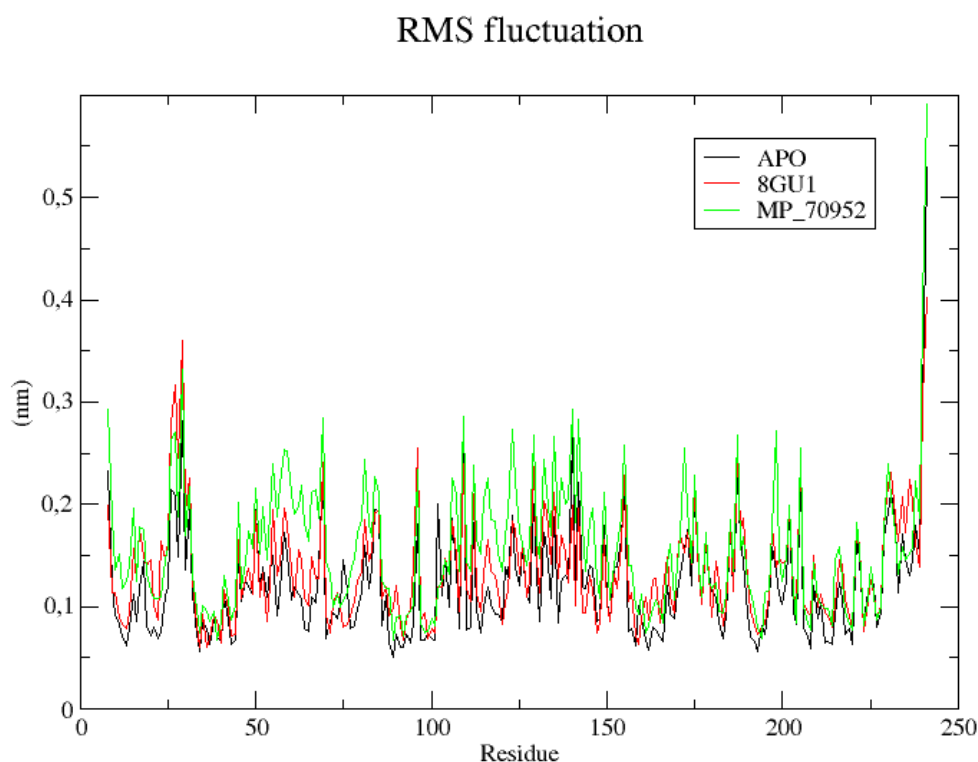


Fonte: Elaborado pelo autor (2026).

Na extremidade oposta, o complexo da molécula MP_70952 apresentou a maior flutuação da série ($0,16 \pm 0,06$ nm), ultrapassando o limiar de tolerância estrutural estabelecido ($> 0,15$ nm). Este comportamento indica que a interação com a MP_70952 é transiente ou geometricamente desfavorável, permitindo que as alças do sítio ativo continuem se movendo de forma dispersa. Esse dado corrobora a sua baixa classificação

geral e reflete uma instabilidade que poderia inviabilizar a inibição *in planta* (Figura 10).

Figura 10 – Aumento da flutuação residual (RMSF) induzido pela molécula MP_70952, refletindo instabilidade e alta mobilidade nas alças do sítio ativo.



Fonte: Elaborado pelo autor (2026).

O menor número de mudanças conformacionais observado nas moléculas de melhor desempenho, especialmente na NB_2472, é um forte indicativo de que a termodinâmica de ligação está sendo governada por interações intermoleculares altamente específicas e direcionadas. A natureza e a persistência destas interações, essenciais para justificar a rigidez do complexo, são quantificadas a seguir na avaliação da rede de ligações de hidrogênio.

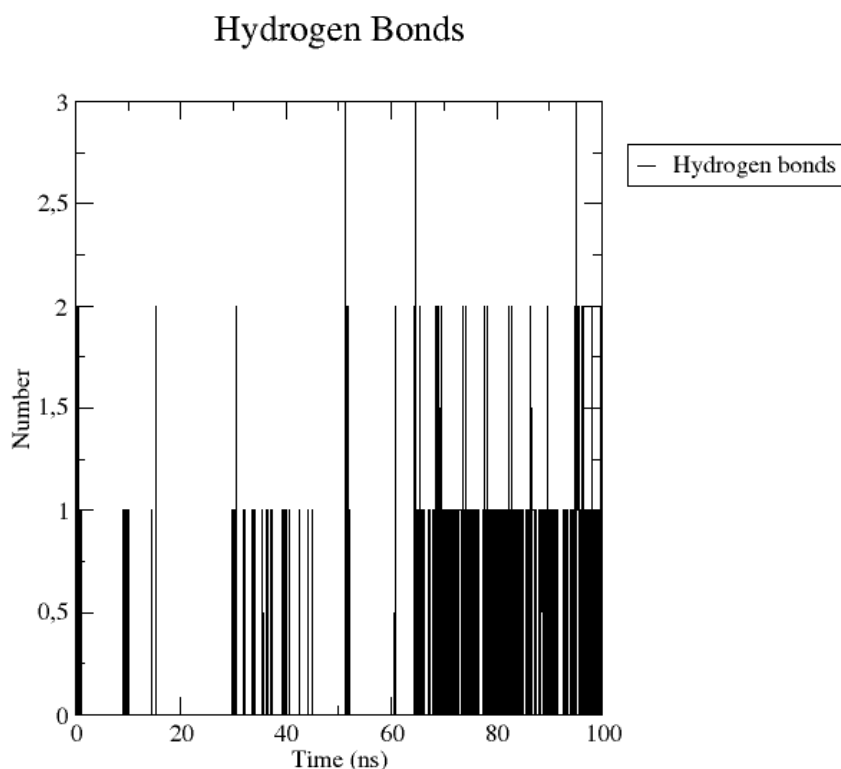
5.3. Análise da Rede de Ligações de Hidrogênio (*H-bond*)

As ligações de hidrogênio desempenham um papel fundamental na estabilização de complexos proteína-ligante, conferindo especificidade e direcionalidade à interação molecular (Nelson; Cox, 2012). Ao longo da simulação de 100 ns, a quantificação

destas fornece uma métrica crucial sobre a persistência do ancoramento do ligante na fenda de ligação da CLasTcyA, sendo expressa pela relação entre a média de ligações mantidas ao longo do tempo e o pico máximo de interações simultâneas.

A molécula de referência (8GU1) apresentou uma rede de interações de baixa persistência, com uma média de persistência de apenas 0,22 e um pico máximo de 3,0 ligações. Este dado indica que a sua permanência no sítio ativo do receptor depende majoritariamente de forças não direcionais (como interações hidrofóbicas ou de *van der Waals*), o que corrobora a sua menor eficiência em imobilizar os resíduos locais, conforme observado na flutuação residual (RMSF), e de acordo com a Figura 11.

Figura 11 – Perfil quantitativo de ligações de hidrogênio (*H-bonds*) estabelecidas pela molécula de referência (8GU1) ao longo dos 100 ns de simulação, evidenciando uma rede de interação fraca e transiente.

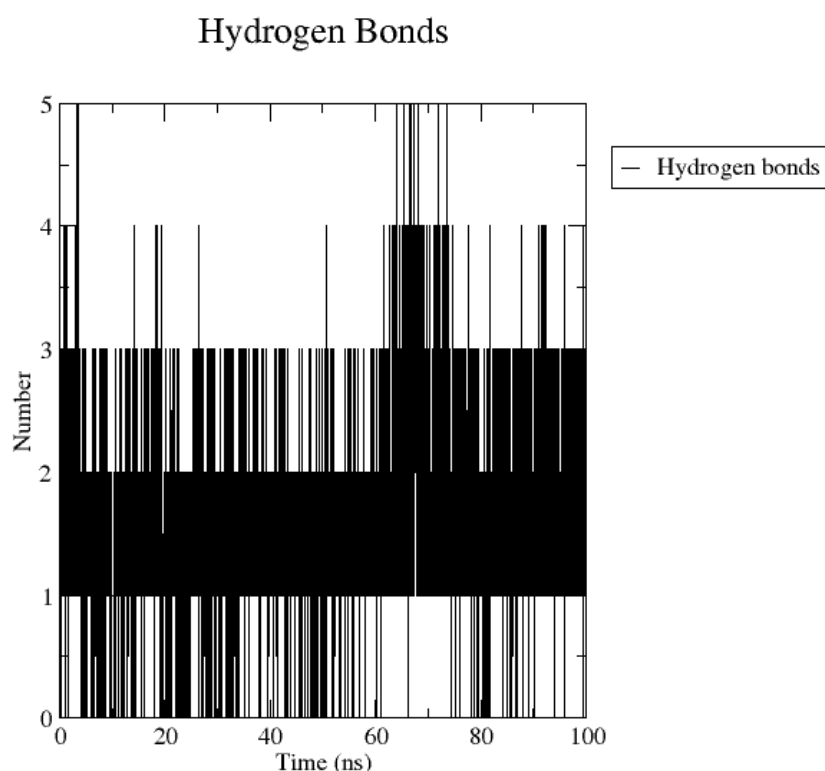


Fonte: Elaborado pelo autor (2026).

Superando amplamente a referência, diversos candidatos estabeleceram redes de hidrogênio robustas e persistentes. O principal destaque nesse parâmetro foi a molécula MP_83140, que registrou a maior média da triagem (2,28) e picos de até 6,0 ligações simultâneas. O candidato líder em estabilidade e segurança, NB_2472, também confirmou sua elevada capacidade de reconhecimento molecular, mantendo uma média

de 1,58 e um pico de 5,0. Estes valores (superiores ao limiar de 1,5 estabelecido para alta especificidade) justificam mecanicamente a estabilidade estrutural do sítio ativo discutido anteriormente: as múltiplas ligações de hidrogênio provavelmente estão atuando como âncoras geométricas que restringem a flexibilidade da proteína (Figura 12).

Figura 12 – Persistência e multiplicidade da rede de ligações de hidrogênio estabelecida pelo candidato líder NB_2472, justificando a sua elevada restrição conformacional.



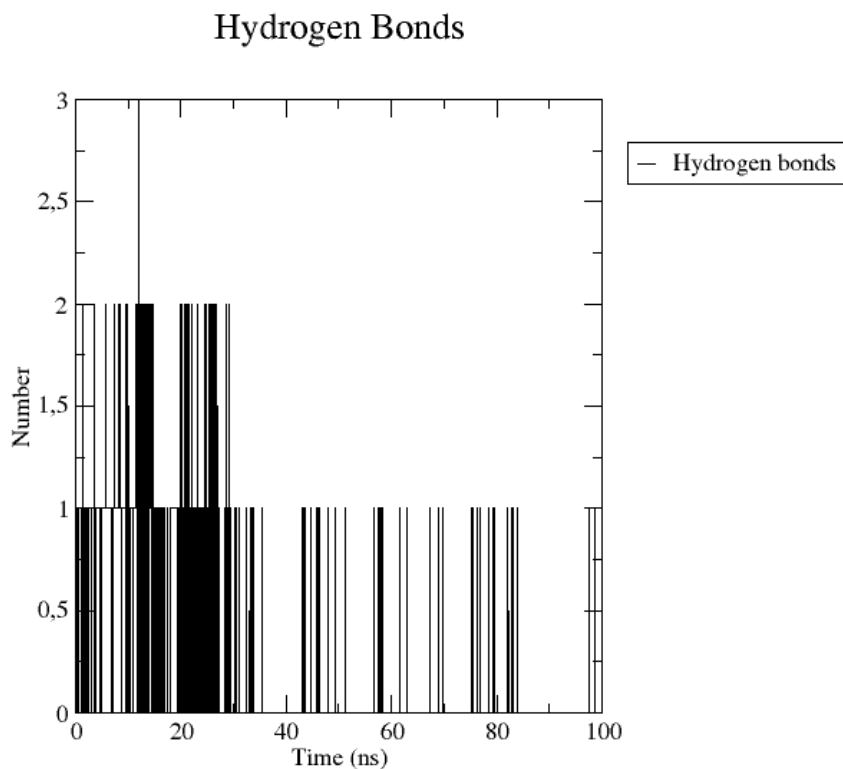
Fonte: Elaborado pelo autor (2026).

A molécula MP_8547, embora tenha apresentado a maior estabilidade global (RMSD), apresentou uma persistência intermediária de ligações de hidrogênio (1,19 / pico de 5,0), sugerindo um modelo de ligação híbrido, sustentado tanto por contatos polares quanto por acomodação hidrofóbica.

Destaca-se, adicionalmente, o comportamento da molécula NB_1260. Apesar de figurar entre as cinco moléculas com maior estabilidade conformacional (RMSD de 0,16 nm), ela apresentou uma rede de ligações de hidrogênio limitada (média de 0,26 / pico de 3,0). Este fenômeno evidencia que a estabilização deste complexo é quase exclusivamente governada por interações apolares e pelo efeito hidrofóbico,

compensando a falta de ligações de hidrogênio com um empacotamento extremamente denso (Figura 13).

Figura 13 – Demonstração da escassez de ligações de hidrogênio no complexo com a molécula NB_1260, ilustrando um modelo de ancoragem majoritariamente orientado pelo efeito hidrofóbico.



Fonte: Elaborado pelo autor (2026).

Em suma, a persistência das ligações de hidrogênio diferencia as interações transientes daquelas altamente específicas. Contudo, a força motriz definitiva que dita se o complexo se manterá associado de forma termodinamicamente favorável é a energia livre do sistema. A quantificação destas contribuições energéticas é explorada no tópico a seguir.

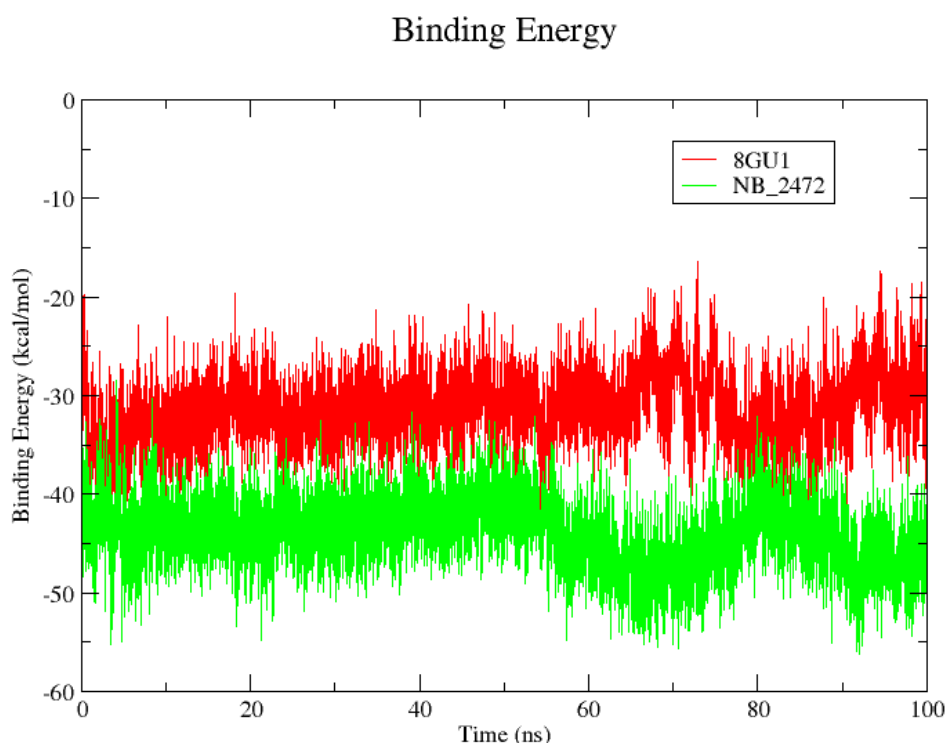
5.4. Termodinâmica e Energias de Interação (Energy)

A avaliação da energia livre de ligação constitui o parâmetro definitivo para atestar a afinidade e a espontaneidade da interação (Nelson; Cox, 2012). O complexo de referência (8GU1) registrou uma energia média de $-31,44 \pm 3,64$ kcal/mol, valor que

corroborar os achados de RMSF e *H-bonds*, servindo como o limiar de corte (baseline) para validar a superioridade dos novos candidatos.

Entre os ligantes testados, a molécula NB_1261 apresentou a maior força de atração ($-57,48 \pm 4,53$ kcal/mol), enquanto a candidata líder, NB_2472, obteve $-44,09 \pm 3,54$ kcal/mol. O principal diferencial da NB_2472 reside na baixa variância ($\pm 3,54$), comprovando uma interação constante e ininterrupta ao longo dos 100 ns, superando a referência em quase 13 kcal/mol (Figura 14).

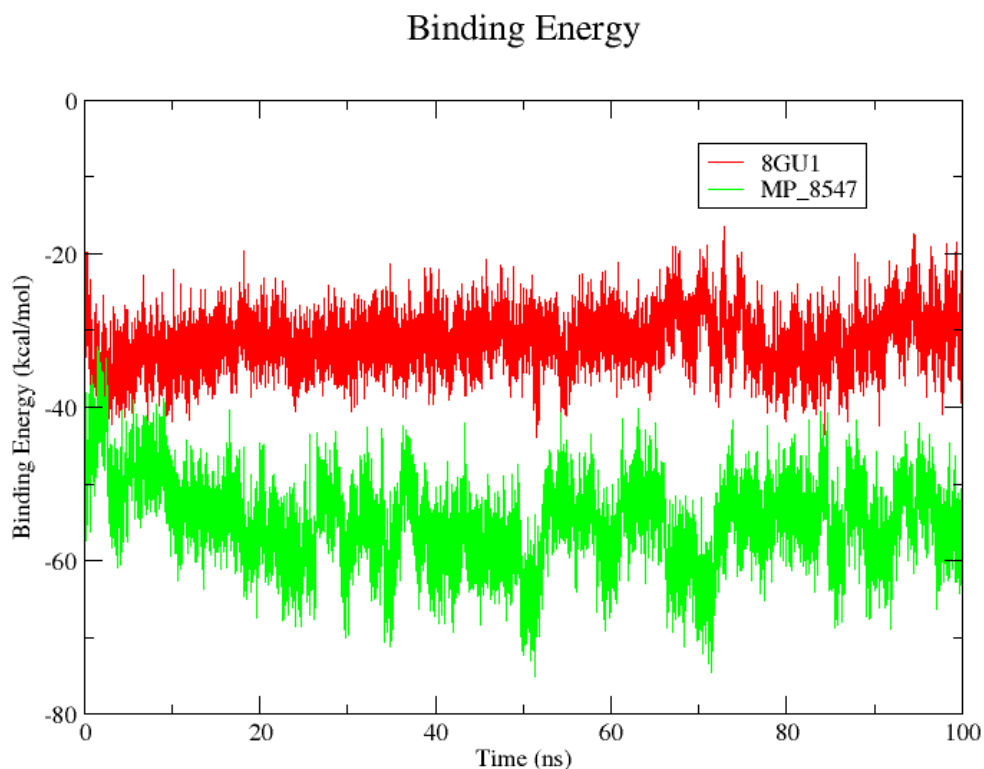
Figura 14 – Evolução da energia livre de ligação do candidato líder NB_2472 em contraste com a molécula de referência (8GU1), evidenciando a alta afinidade e a elevada estabilidade termodinâmica contínua.



Fonte: Elaborado pelo autor (2026).

Apesar do valor médio favorável ($-43,22$ kcal/mol), a molécula MP_8547 exibiu um elevado desvio padrão ($\pm 12,69$). Essa flutuação termodinâmica indica um encaixe cineticamente instável, com períodos alternados de forte atração e distanciamento no sítio ativo. Esse comportamento sugere que o ligante é suscetível a se desprender temporariamente do receptor, comprometendo a eficácia da inibição de forma contínua e tornando a sua ancoragem menos confiável do que a dos candidatos líderes (Figura 15).

Figura 15 – Flutuação termodinâmica acentuada observada no complexo com a molécula MP_8547, ilustrando períodos alternados de atração e afrouxamento do ligante ao longo da simulação.



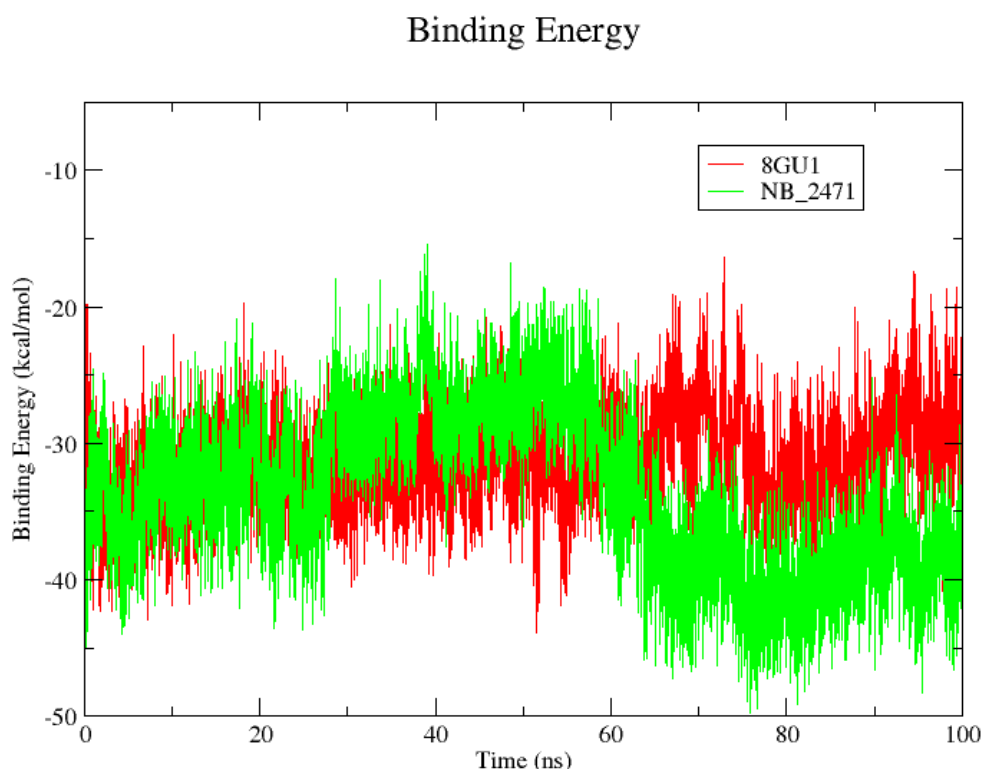
Fonte: Elaborado pelo autor (2026).

Por outro lado, os candidatos que apresentaram as menores afinidades na triagem, representados pelas moléculas NB_2458 ($-33,48 \pm 3,72$ kcal/mol) e NB_2471 ($-33,72 \pm 5,93$ kcal/mol), apresentaram valores termodinâmicos muito próximos ao limiar de corte estabelecido pela referência 8GU1. Essa proximidade energética sugere que, embora a interação seja favorável, a força de ancoragem no sítio ativo não é robusta o suficiente para restringir os movimentos da proteína com a mesma eficiência observada nos compostos líderes.

Essa fragilidade na manutenção do complexo justifica os maiores níveis de flutuação residual detectados nas análises de RMSF, na qual o ligante permite uma maior liberdade conformacional dos resíduos que compõem a fenda de ligação. Do ponto de vista estrutural, uma energia livre nessa faixa limítrofe demonstra que o inibidor não consegue superar as barreiras termodinâmicas necessárias para induzir o fechamento completo dos domínios do receptor. Como resultado, o mecanismo de captação não é devidamente travado, permitindo a infiltração de moléculas do solvente na fenda e agravando a instabilidade global do sistema, um comportamento que fica

evidente ao observarmos o perfil de oscilação energética contínua desses complexos (Figura 16).

Figura 16 – Perfil energético de afinidade limítrofe apresentado pela molécula NB_2471, demonstrando valores muito próximos à linha de base de eficiência estabelecida pela referência (8GU1).



Fonte: Elaborado pelo autor (2026).

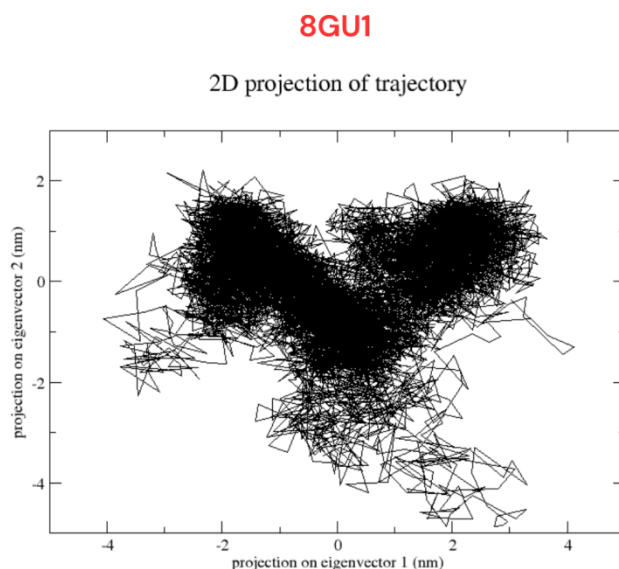
Diante desse cenário, torna-se imperativo investigar como essas diferentes magnitudes de energia livre de ligação refletem na movimentação global do sistema. Afinal, a eficácia de um inibidor não é medida apenas pela magnitude da atração local, mas pela sua capacidade de interferir na dinâmica intrínseca e nos movimentos coletivos de grande amplitude do receptor. Portanto, a exploração do espaço essencial e o confinamento conformacional da proteína sob a influência de cada ligante serão detalhadamente elucidados a seguir, por meio da análise de componentes principais (PCA), fundamentada nos princípios da dinâmica essencial de proteínas. Compreender essa transição de uma inibição puramente termodinâmica para um bloqueio mecanicista global é o passo definitivo para atestar quais moléculas são verdadeiramente capazes de neutralizar a captação de nutrientes pelo fitopatógeno, assegurando o potencial prático do bioproduto agrícola.

5.5. Exploração do Espaço Conformacional (PCA)

A análise de componentes principais (PCA) foi aplicada para isolar os movimentos coletivos de grande amplitude (espaço essencial) da proteína CLasTcyA, separando-os do ruído térmico aleatório de fundo. O rastreamento destes movimentos concertados permite quantificar a "área" do espaço conformacional explorado pelo complexo ao longo dos 100 ns (Amadei; Linssen; Berendsen, 1993). Na perspectiva da inibição do transporte, ligantes altamente eficazes tendem a restringir a exploração deste espaço, confinando a proteína a um estado conformacional mais rígido e compacto, o que desfavorece a captação do substrato (Henzler-Wildman; Kern, 2007).

A proteína no seu estado livre (APO) cobriu uma área de projeção bidimensional de 41,80 nm², definindo o limite de compacidade natural da proteína não ligada. A inserção da molécula de referência (8GU1) induziu uma expansão deste espaço para 57,99 nm², classificada como uma exploração "Moderada". Este alargamento sugere que o ligante de controle, embora consiga manter-se no sítio ativo, permite (ou induz) uma maior instabilidade estrutural (Figura 17).

Figura 17 – Projeção 2D da Análise de Componentes Principais (PCA) do complexo com o ligante de referência (8GU1), ilustrando a área de exploração conformacional que serve como linha de base visual para a triagem dos novos inibidores.

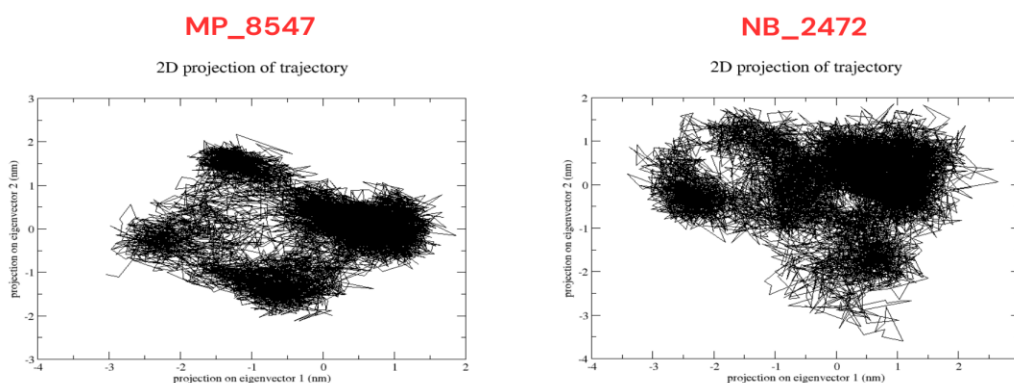


Fonte: Elaborado pelo autor (2026).

Em contrapartida, os principais candidatos do estudo demonstraram uma elevada capacidade de confinamento estrutural. A molécula MP_8547 reduziu o espaço

essencial para um valor restrito de 21,04 nm². De forma semelhante, o candidato líder em termos termodinâmicos, NB_2472, assim como as moléculas MP_83140 e NB_1261, mantiveram o sistema em um regime altamente "compacto" (com áreas em torno dos 31,98 a 33,36 nm²). Esta expressiva redução na área de exploração conformacional em relação à referência indica que a presença do ligante pode estar funcionando como um restritor estrutural que impede as transições de grande escala necessárias para o funcionamento do receptor (Figura 18).

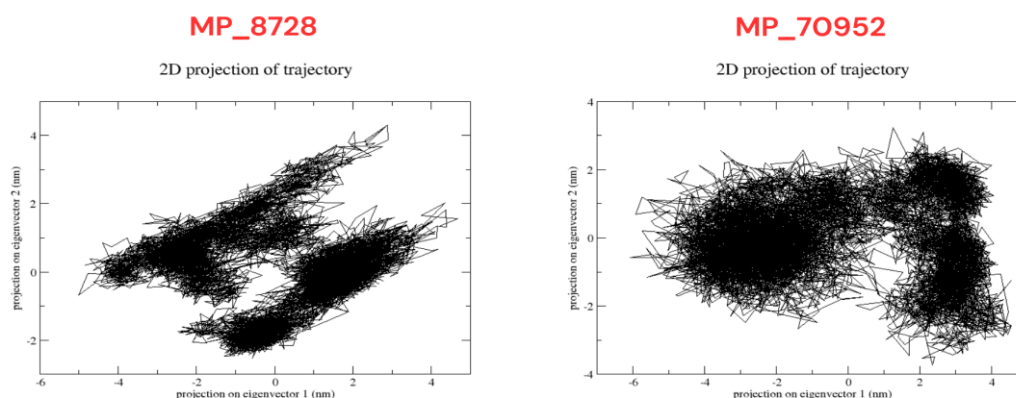
Figura 18 – Restrição expressiva do espaço essencial promovida pelos candidatos de alta afinidade. À esquerda, a compacidade extrema induzida pela MP_8547. À direita, a restrição conformacional alcançada pelo candidato líder NB_2472.



Fonte: Elaborado pelo autor (2026).

No polo oposto da avaliação, moléculas como a MP_8728 (66,14 nm²) e a MP_70952 (73,93 nm²) apresentaram perfis de alta dispersão indicando instabilidade estrutural. Esta vasta área de exploração indica que o complexo proteína-ligante sofreu amplas mudanças conformacionais durante a simulação, refletindo uma fraca estabilização global. Estes dados corroboram diretamente os altos valores de RMSF observados anteriormente para as mesmas moléculas, confirmando que a ineficiência local no sítio ativo se traduz em uma desestabilização global de toda a proteína. Esse grau de dispersão estrutural revela a incapacidade desses ligantes em atuar como verdadeiras "travas" conformacionais, permitindo que o receptor continue executando seus movimentos de grande amplitude. Consequentemente, a inibição sustentada torna-se inviável, visto que o complexo não resiste à força motriz das transições naturais do receptor, justificando a exclusão definitiva dessas moléculas do rol de candidatas principais (Figura 19).

Figura 19 – Perfis de dispersão estrutural crítica (instabilidade). À esquerda, a vasta área conformacional explorada pelo complexo com a MP_8728. À direita, a acentuada desestabilização global induzida pela molécula MP_70952.



Fonte: Elaborado pelo autor (2026).

Para sintetizar o complexo volume de dados gerados ao longo das simulações de dinâmica molecular, bem como para estabelecer um critério estritamente racional de seleção para a etapa subsequente, foi estruturado um ranqueamento global multiparamétrico (Tabela 1). A adoção desta métrica garante que a classificação final não se baseie em um único fator físico-químico isolado, mitigando o risco de análises enviesadas. Em vez disso, a validação fundamenta-se na intersecção rigorosa de cinco parâmetros cruciais extraídos da trajetória de 100 ns: a estabilidade termodinâmica global (RMSD), a intensidade da afinidade teórica (Energia Livre), a especificidade da rede de interações via ligações de hidrogênio (*H-bonds*), o impedimento da flexibilidade dos resíduos do sítio ativo (RMSF) e a compacidade conformacional do sistema (PCA).

Com o intuito de facilitar a avaliação comparativa e otimizar a tomada de decisão biológica frente a esses dados, adotou-se um sistema visual de categorização cromática. Neste modelo, o nível verde indica parâmetros de alta estabilidade e forte interação inibitória; o nível amarelo sinaliza valores referentes a incertezas estatísticas ou similares ao patamar de eficiência estabelecido pelo controle positivo (8GU1); e o nível vermelho aponta para instabilidade estrutural severa ou baixa afinidade termodinâmica ao longo do tempo. Dessa forma, as moléculas posicionadas no topo deste *ranking* não apenas apresentam os melhores escores individuais, mas representam o equilíbrio ideal entre força de ligação e permanência estrutural.

Tabela 1 – Ranqueamento global multiparamétrico dos complexos proteína-ligante, resumindo os perfis de estabilidade estrutural (RMSD e RMSF), afinidade termodinâmica (Energia Livre), especificidade (*H-Bonds*) e compacidade (PCA) ao longo de 100 ns de simulação.

Ranking	RMSD Médio (Estabilidade)	Energia (kcal/mol)	<i>H-Bonds</i> (Média/Pico)	RMSF (Sítio Ativo)	PCA (Espaço Essencial)
APO	0,14 ± 0,02	-	-	0,12 ± 0,05	41,80 nm ² (Compacto)
Ref. 8GU1	0,19 ± 0,03	-31,44 ± 3,64	0,22 / 3,0	0,14 ± 0,05	57,99 nm ² (Moderado)
1°. MP_8547	0,18 ± 0,02	-43,22 ± 12,69	1,19 / 5,0	0,11 ± 0,06	21,04 nm ² (Compacto)
2°. NB_2472	0,16 ± 0,02	-44,09 ± 3,54	1,58 / 5,0	0,12 ± 0,06	33,07 nm ² (Compacto)
3°. MP_83140	0,19 ± 0,03	-39,11 ± 9,03	2,28 / 6,0	0,13 ± 0,05	31,98 nm ² (Compacto)
4°. NB_1261	0,15 ± 0,01	-57,48 ± 4,53	0,90 / 2,0	0,12 ± 0,06	33,36 nm ² (Compacto)
5°. NB_1260	0,16 ± 0,03	-40,83 ± 10,52	0,26 / 3,0	0,12 ± 0,05	36,43 nm ² (Compacto)
6°. MP_36220	0,19 ± 0,03	-44,12 ± 3,74	1,10 / 5,0	0,13 ± 0,06	51,71 nm ² (Moderado)
7°. NB_2471	0,22 ± 0,05	-33,72 ± 5,93	0,90 / 5,0	0,14 ± 0,06	57,05 nm ² (Moderado)
8°. MP_8728	0,21 ± 0,04	-39,66 ± 6,26	1,45 / 5,0	0,14 ± 0,06	66,14 nm ² (Disperso)
9°. NB_2458	0,20 ± 0,03	-33,48 ± 3,72	0,18 / 4,0	0,13 ± 0,07	52,20 nm ² (Moderado)
10°. MP_70952	0,22 ± 0,06	-35,30 ± 6,51	0,67 / 4,0	0,16 ± 0,06	73,93 nm ² (Disperso)

Fonte: Elaborado pelo autor (2026).

Nota: O ranking foi estabelecido priorizando os seguintes limiares de corte metodológicos: (1) **RMSD:** ≤ 0,20 nm; (2) **Energia:** ≤ -40 kcal/mol; (3) ***H-Bonds*:** média de persistência ≥ 1,5; (4) **RMSF:** ≤ 0,10 nm; e (5) **PCA:** perfil compacto. A categorização cromática em **verde (alta estabilidade)**, **amarelo (limítrofe/controle 8GU1)** e **vermelho (instabilidade)** reflete o nível de atendimento a estes parâmetros, conforme detalhado no texto principal. Cabe ressaltar que candidatos como a NB_1260 compensam a menor frequência de interações de hidrogênio diretas com uma excepcional estabilidade de energia livre e alta compacidade estrutural.

Com a validação termodinâmica e estrutural concluída, evidenciou-se que candidatos como a NB_2472 e a MP_8547 possuem interações termodinamicamente favoráveis no alvo biológico. Contudo, para que um inibidor transite do ambiente virtual (*in silico*) para a aplicação prática no campo como um bioproduto agrícola contra o HLB, a estabilidade dinâmica deve ser acompanhada de rigorosa segurança ecotoxicológica. O cruzamento destes dados estruturais com os preditores de viabilidade sistêmica é elucidado a seguir.

5.6. Perfil ADMET e Viabilidade Sistêmica em Citros

A elevada estabilidade termodinâmica no sítio ativo, atestada pelas simulações de dinâmica molecular, é apenas o primeiro requisito no planejamento de um bioproduto agrícola. Para que um inibidor da CLasTcyA atue eficazmente no combate ao *huanglongbing* (HLB), este deve ser capaz de translocar pelo sistema vascular da planta (floema), ser economicamente viável para síntese industrial e, impreterivelmente, não representar riscos toxicológicos para o aplicador humano e para o ecossistema (especialmente polinizadores). A aplicação dos filtros ADMET (absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade) funcionou como uma etapa de exclusão rigorosa (filtro *Go/No-Go*).

O impacto desta triagem torna-se evidente ao analisar os candidatos líderes na dinâmica molecular. A molécula MP_8547, que obteve o primeiro lugar em estabilidade estrutural (RMSD) e imobilização do sítio ativo (RMSF), foi sumariamente reprovada nos filtros ecológicos e de segurança humana. A sua classificação como "*Toxic*" para o Teste de Ames (mutagenicidade) e o elevado índice de dificuldade de síntese (*SA Score* > 6.0) inviabilizam completamente a sua aplicação no campo. De forma semelhante, a candidata MP_36220, que possuía o melhor coeficiente de partição (Log P de 1.80) para translocação sistêmica ideal no floema, foi inviabilizada ao também apresentar potencial mutagênico bacteriano.

Outro perfil de eliminação clássico ocorreu com os compostos naturais NB_1260 e NB_1261. Apesar de manterem o complexo proteico altamente compacto (PCA), estas moléculas revelaram uma lipofilia excessiva (Log P > 6.4). Num cenário biológico real, moléculas tão lipofílicas ficariam retidas na cutícula cerosa das folhas dos citros ou presas nas membranas celulares, não alcançando a bactéria no floema. Aliado a isto, o seu *SA Score* superior a 7.0 torna a extração ou síntese em larga escala economicamente impraticável.

Ao cruzar os perfis estruturais com as exigências farmacocinéticas, a molécula semissintética NB_2472 emergiu como o candidato a composto líder (*Hit*) deste estudo. Além de apresentar os segundos melhores índices de afinidade termodinâmica e estabilidade conformacional, a NB_2472 demonstrou um perfil ADMET altamente favorável. Foi atestada como segura para mutagenicidade (*Ames Safe*), possui uma lipofilia aceitável (Log P de 4.06) e apresenta um *SA Score* de 4.29, indicando uma elevada viabilidade de produção industrial em comparação com as moléculas sintéticas

reprovadas. A sua posição como inibidor da bomba de efluxo (P-gp) sugere ainda uma elevada persistência biológica no interior do patógeno. O perfil farmacocinético e toxicológico completo dos candidatos promissores e reprovados encontra-se consolidado na Tabela 2.

Tabela 2 – Predições de propriedades farmacocinéticas, físico-químicas e toxicológicas (ADMET) para os compostos líderes e a molécula de referência (8GU1).

Ranking	Log P	Log S	TPSA	hERG	Bee	Ames	P-gp	SA
Ref.	5.72	-6.67	41.03	Toxic (1.0)	Toxic (0.66)	Safe (0.0)	Inhb (1.0)	3.20
1°. 2458	3.78	-4.68	106.59	Safe (0.257)	Toxic (0.801)	Safe (0.206)	Inhb (0.973)	4.76
2°. 2472	4.06	-4.73	106.59	Toxic (0.793)	Toxic (0.758)	Safe (0.01)	Inhb (1.0)	4.29
3°. 2471	4.11	-4.77	89.52	Toxic (0.99)	Toxic (0.824)	Safe (0.008)	Inhb (0.999)	4.05
4°. 83140	3.83	-5.13	156.12	Toxic (0.998)	Toxic (0.842)	Safe (0.068)	Inhb (0.995)	5.68
5°. 36220	1.80	-3.57	182.47	Safe (0.21)	Toxic (0.844)	Toxic (0.862)	Inhb (0.998)	6.00
6°. 8547	2.71	-4.80	182.47	Toxic (0.814)	Toxic (0.834)	Toxic (0.908)	Inhb (1.0)	6.09
7°. 8728	2.65	-4.80	182.47	Toxic (0.808)	Toxic (0.835)	Toxic (0.98)	Inhb (1.0)	6.09
8°. 70952	2.82	-4.52	182.47	Toxic (0.701)	Toxic (0.854)	Toxic (0.846)	Inhb (1.0)	6.37
9°. 1260	6.40	-7.10	78.90	Toxic (0.988)	Toxic (0.973)	Safe (0.028)	N-Inhb (0.079)	7.22
10°. 1261	6.46	-7.23	78.90	Toxic (0.959)	Toxic (0.974)	Safe (0.066)	N-Inhb (0.112)	7.19

Fonte: Elaborado pelo autor (2026).

Nota: Ranking prioriza o equilíbrio entre conformidade ecotoxicológica, translocação no hospedeiro e viabilidade industrial. Valores ideais: **Log P** (1.0 a 3.0); **Log S** (> -4.0); **TPSA** (60 a 90 Å²); **hERG**, **Bee** e **Ames** (*Safe*); **P-gp** (*Inhibitor*); **SA Score** (< 4.0). Valores entre parênteses indicam o índice de confiança preditiva (0 a 1).

Estrategicamente, a triagem permitiu também a identificação de candidatos secundários para futuras avaliações *in vitro*. A molécula NB_2458 destacou-se por apresentar o perfil mais seguro de todo o estudo, sendo a única com dupla classificação *Safe* (ausência de mutagenicidade e de toxicidade cardíaca - hERG), enquanto a NB_2471 apresentou o menor custo de acessibilidade sintética (SA 4.05).

A matriz de decisão final atesta o sucesso da metodologia de funil adotada: a eliminação sistemática de falsos positivos teóricos permitiu isolar, de forma racional, os compostos que representam o equilíbrio exato entre o ancoramento termodinâmico inibitório e a segurança de aplicação sistêmica no combate à *Candidatus Liberibacter asiaticus*, conforme a consolidação dos dados exposta na Tabela 3.

Tabela 3 – Matriz de Seleção e Veredicto Científico, consolidando o desempenho no alvo e o perfil ADMET para a classificação final dos candidatos a inibidores da CLasTcyA.

Status Final	Desempenho no Alvo (MD)	Perfil ADMET	Veredicto Científico
8GU1	Estabilidade Moderada / Afinidade Base	Não Mutagênica / Cardiotóxica	Baseline de Comparação
Hit (Líder) NB_2472	Excelente (2º Lugar): Alta compacidade e afinidade.	Aprovada (2º Lugar): Ames <i>Safe</i> e viável (SA 4.29).	Candidato Líder (Melhor perfil duplo)
Backup (1) NB_2458	Moderado (9º Lugar): Estável, mas menor afinidade.	Excelente (1º Lugar): Única Duplo <i>Safe</i> (hERG/Ames).	Candidato Backup (Foco em Segurança)
Backup (2) NB_2471	Moderado (7º Lugar): Dinâmica estável, RMSD limítrofe.	Aprovada (3º Lugar): Ames <i>Safe</i> e síntese barata.	Candidato Backup (Foco em Custo/Síntese)
Aprovada MP_83140	Bom (3º Lugar): Ótima estabilidade e muitas pontes de hidrogênio.	Aprovada (4º Lugar): Ames <i>Safe</i> , porém síntese mais cara (SA 5.68).	Hit Secundário
Eliminada MP_8547	Excelente (1º Lugar): Melhor estabilizadora do sítio ativo.	Reprovada: Mutagênica (Ames <i>Toxic</i>) e síntese difícil.	Falha Ecotoxicológica
Eliminada MP_36220	Bom (6º Lugar): Excelente energia e mobilidade.	Reprovada: Mutagênica (Ames <i>Toxic</i>).	Falha Ecotoxicológica
Eliminada NB_1261	Bom (4º Lugar): Afinidade teórica altíssima.	Reprovada: Não transloca (Log P > 6) e síntese inviável (SA > 7).	Falha Sintética/Cinética
Eliminada NB_1260	Bom (5º Lugar): Dinâmica compacta.	Reprovada: Não transloca (Log P > 6) e síntese inviável (SA > 7).	Falha Sintética/Cinética
Eliminada MP_8728	Ruim (8º Lugar): Dispersa estruturalmente.	Reprovada: Mutagênica (Ames <i>Toxic</i>).	Falha Dupla
Eliminada MP_70952	Ruim (10º Lugar): Instável e alta flexibilidade (RMSF).	Reprovada: Mutagênica (Ames <i>Toxic</i>) e risco cardíaco.	Falha Dupla

Fonte: Elaborado pelo autor (2026).

Nota: Veredicto consolida **dinâmica** e **ADMET** via filtros *Go/No-Go*. Candidatos "Eliminados" falharam em segurança/viabilidade. NB_2472 é o **Hit** (estável e não mutagênico). **Backups** garantem segurança (NB_2458) ou viabilidade sintética (NB_2471).

Na prática agrícola, a endoterapia vegetal (injeção no tronco) é a via de entrega ideal, pois contorna a cutícula foliar e introduz o inibidor diretamente no floema, habitat do *Candidatus Liberibacter asiaticus*. O uso de nanocarreadores pode adequar a solubilidade e maximizar a entrega no alvo, compensando custos pela alta especificidade do tratamento.

Em paralelo, os riscos residuais às abelhas (*Bee Tox*) são mitigáveis pelo manejo integrado de pragas (MIP). Aplicações restritas a árvores sintomáticas, executadas estritamente fora da floração dos citros, neutralizam a exposição dos insetos polinizadores aos bioativos.

6. CONCLUSÃO

Este estudo demonstrou a eficácia da triagem virtual, da dinâmica molecular e da predição farmacocinética na descoberta de novos bioativos contra o *huanglongbing* (HLB). A integração das trajetórias estruturais aos preditores ADMET revelou que a força termodinâmica isolada é insuficiente para validar um bioproduto. Moléculas sintéticas de alta afinidade, como a MP_8547, foram descartadas devido ao alto risco de mutagenicidade e inviabilidade sintética. Em contrapartida, a molécula semissintética NB_2472 consolidou-se como o candidato líder (*Hit*) da pesquisa, equilibrando forte interação inibitória na proteína CLasTcyA, segurança ecotoxicológica (*Ames Safe*) e viabilidade industrial. Adicionalmente, a NB_2458 despontou como um candidato de segunda opção de grande relevância, garantindo a maior segurança toxicológica global da triagem.

A aplicação da dinâmica essencial (PCA) revelou que a eficácia dos melhores candidatos atrela-se à capacidade de restringir o espaço conformacional da proteína, desfavorecendo a dinâmica necessária para o transporte de nutrientes. Aliado a isso, a prospecção na base NuBBE destacou a biodiversidade brasileira como rica fonte de moldes moleculares (*scaffolds*). O perfil promissor da NB_2472 evidencia que integrar produtos naturais com modificações químicas gera soluções mais específicas. Essa via oferece alternativas aos defensivos genéricos de largo espectro, auxiliando ativamente na mitigação de danos ecossistêmicos e à saúde do trabalhador rural.

Por fim, o delineamento adotado apresenta uma alternativa prática para contornar a dificuldade de triagem direta deste fitopatógeno não cultivável. A validação computacional prévia antecipa limitações experimentais, otimizando o direcionamento de recursos para ensaios laboratoriais apenas com as estruturas mais favoráveis. Os inibidores validados neste estudo representam protótipos químicos de alto valor para futuras etapas de otimização estrutural (*hit-to-lead*), nas quais modificações de grupamentos poderão potencializar a afinidade e a acessibilidade sintética. Com isto, a pesquisa fornece subsídios robustos e candidatos altamente qualificados para o avanço rumo às indispensáveis validações biológicas *in vitro* e *in planta*, contribuindo para a mitigação dos impactos severos do HLB na citricultura.

7. REFERÊNCIAS

A NOVA AGRICULTURA. **Diagnóstico de citrus greening por processamento de imagens e fluorescência induzida por laser**. 10 abr. 2023. Disponível em: <https://anovaagricultura.com.br/>. Acesso em: 28 fev. 2026.

AGRODEFESA. **Agrodefesa orienta produtores de Anápolis e região sobre Greening**. Agência Goiana de Defesa Agropecuária, Goiânia, 28 ago. 2024. Disponível em: <https://goias.gov.br/agrodefesa/agrodefesa-orienta-produtores-de-anapolis-e-regiao-sobre-greening/>. Acesso em: 28 fev. 2026.

AKSENOV, A. A. *et al.* Spatial chemistry of citrus reveals molecules bactericidal to *Candidatus Liberibacter asiaticus*. **Scientific Reports**, v. 14, n. 1, p. 20306, 2024.

AMADEI, A.; LINSSEN, A. B.; BERENDSEN, H. J. Essential dynamics of proteins. **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics**, v. 17, n. 4, p. 412-425, 1993.

BATUMAN, O. *et al.* The Use and Impact of Antibiotics in Plant Agriculture: A Review. **Phytopathology**, v. 114, n. 4, p. 885-909, 2024.

CHEMICAL COMPUTING GROUP ULC. **Molecular Operating Environment (MOE)**. Montreal, QC, Canada, 2022.

COLEAGRO. **Psílideo: Monitoramento e Controle**. [2024]. Disponível em: <https://www.coleagro.com.br/>. Acesso em: 28 fev. 2026.

CULTIVAR. **Candidatus Liberibacter asiaticus**. Revista Cultivar, 16 jun. 2025. Disponível em: <https://revistacultivar.com.br/home>. Acesso em: 28 fev. 2026.

DAINA, A. *et al.* SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. **Scientific Reports**, v. 7, p. 42717, 2017.

GHOSH, D. *et al.* Huanglongbing Pandemic: Current Challenges and Emerging Management Strategies. **Plants**, v. 12, n. 1, p. 160, 2023.

HAWKINS, P. C. D. *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.

HENZLER-WILDMAN, K.; KERN, D. Dynamic personalities of proteins. **Nature**, v. 450, n. 7172, p. 964-972, 2007.

HUMPHREY, W.; DALKE, A.; SCHULTEN, K. VMD: visual molecular dynamics. **Journal of Molecular Graphics**, v. 14, n. 1, p. 33-38, 1996.

IRIGOYEN, S. *et al.* Plant hairy roots enable high throughput identification of antimicrobials against *Candidatus Liberibacter spp.* **Nature Communications**, v. 11, n. 1, p. 5802, 2020.

JAIN, A. *et al.* A Brief Description of the MOE (Molecular Operating Environment) Software Package and Its Applications. **Current Computer-Aided Drug Design**, v. 14, n. 1, p. 7-17, 2018.

KUMAR, P. *et al.* Crystal structures of a putative periplasmatic cystine-binding protein from *Candidatus Liberibacter asiaticus*: insights into an adapted mechanism of ligand binding. **FEBS Journal**, v. 286, n. 17, p. 3462-3474, 2019.

LEACH, A. R. **Molecular modelling: principles and applications**. 2. ed. Harlow, England: Prentice Hall / Pearson Education, 2001.

LIPINSKI, C. A. *et al.* Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 46, n. 1-3, p. 3-26, 2001.

LONARE, S. *et al.* Identification and evaluation of potential inhibitor molecules against TcyA from *Candidatus Liberibacter asiaticus*. **Journal of Structural Biology**, v. 215, n. 4, p. 107992, 2023.

MA, W. *et al.* Citrus Huanglongbing is a pathogen-triggered immune disease that can be mitigated with antioxidants and gibberellin. **Nature Communications**, v. 13, n. 1, p. 529, 2022.

MADIGAN, M. T. *et al.* **Brock biology of microorganisms**. 14. ed. Boston: Pearson Education, 2015.

MARKOSSIAN, S. *et al.* **Assay guidance manual**. Bethesda, MD: Eli Lilly & Company; National Center for Advancing Translational Sciences, 2004. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK53196/>. Acesso em: 15 dez. 2025.

MOHAN, K. *et al.* Chitosan-based insecticide formulations for insect pest control management: A review of current trends and challenges. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 280, p. 135937, 2024.

MORFOANATOMIA VEGETAL. **Tecidos vegetais**. 2024. Disponível em: <https://morfoanatomiavegetal.wordpress.com/tecidos-vegetais/>. Acesso em: 28 fev. 2026.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger's principles of biochemistry**. 6. ed. New York: W.H. Freeman, 2012.

OPENEYE SCIENTIFIC SOFTWARE. **FILTER**. Santa Fe, NM, USA. Disponível em: <https://www.eyesopen.com/filter>. Acesso em: 04 mar. 2026a.

OPENEYE SCIENTIFIC SOFTWARE. **QUACPAC**. Santa Fe, NM, USA. Disponível em: <https://www.eyesopen.com/quacpac>. Acesso em: 04 mar. 2026b.

PATRICK, G. L. **An introduction to medicinal chemistry**. 7. ed. Oxford, UK: Oxford University Press, 2023.

RCSB PROTEIN DATA BANK. **Homepage**. Disponível em: <https://www.rcsb.org/>. Acesso em: 28 fev. 2026.

ROCHE, V. F. *et al.* **Foye's principles of medicinal chemistry**. 8. ed. Philadelphia: Wolters Kluwer, 2020.

SILVA, I. P. *et al.* Volatile compounds in citrus in adaptation to water deficit and to herbivory by *Diaphorina citri*: How the secondary metabolism of the plant is modulated under concurrent stresses. A review. **Plant Science**, v. 346, p. 112157, 2024.

SONG, W.-H. *et al.* Deep-PK: a deep learning approach for molecular pharmacokinetic and toxicity prediction. **Nucleic Acids Research**, v. 52, n. W1, p. W469-W477, 2024.

SUPERINTERESSANTE. **Esta planta carnívora sabe contar**. 3 fev. 2016. Disponível em: <https://super.abril.com.br/ciencia/esta-planta-carnivora-sabe-contar/>. Acesso em: 28 fev. 2026.

TURNER, P. J. **XMGRACE, Version 5.1.19**. Center for Coastal and Land-Margin Research, Oregon Graduate Institute of Science and Technology, Beaverton, OR, 2005.

VALDÉS-TRESANCO, M. S. *et al.* gmx_MMPBSA: A New Tool to Perform End-State Free Energy Calculations with GROMACS. **Journal of Chemical Theory and Computation**, v. 17, n. 10, p. 6281-6291, 2021.

VALLI, M. *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.

VAN DER SPOEL, D. *et al.* GROMACS molecule & liquid database. **Bioinformatics**, v. 28, n. 5, p. 752-753, 2012.

VERLI, H. (Org.). **Bioinformática: da biologia à flexibilidade molecular**. 1. ed. São Paulo: Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular - SBBq, 2014.

VILLAR-LUNA, H. *et al.* Economic and Social Impact of Huanglongbing on the Mexico Citrus Industry: A Review and Future Perspectives. **Horticulturae**, v. 10, n. 5, p. 481, 2024.

ZOETE, V. *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.