

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**“IDENTIFICAÇÃO ASSISTIDA POR DOCKING MOLECULAR  
DE POTENCIAIS ALVOS EM *PLASMODIUM FALCIPARUM*  
PARA DERIVADOS DE INDOL-3-GLIOXILTROSINA COM  
ATIVIDADE ANTIMALÁRICA *IN VITRO*”**

**María José Dávila Rodríguez\***

Tese apresentada como parte dos requisitos  
para obtenção do título de DOUTORA EM  
CIÊNCIAS, área de concentração: QUÍMICA  
INORGÂNICA.

**Orientador: Prof. Dr. Julio Zukerman Schpector  
Co-orientadora: Profa. Dra. Ignez Caracelli**

**\*Bolsista CAPES**

**São Carlos - SP  
2020**



---

**Folha de Aprovação**

---

Defesa de Tese de Doutorado da candidata Maria Jose Davila Rodriguez, realizada em 28/07/2020.

**Comissão Julgadora:**

Prof. Dr. Julio Zukerman Schpector (UFSCar)

Prof. Dr. Hélio Alexandre Stefani (USP)

Prof. Dr. Ricardo Samuel Schwab (UFSCar)

Prof. Dr. Lucas Sousa Madureira (IAE)

Prof. Dr. Leandro Martinez (UNICAMP)

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

O Relatório de Defesa assinado pelos membros da Comissão Julgadora encontra-se arquivado junto ao Programa de Pós-Graduação em Química.

A Carlina Olaya de Rodríguez y Pedro Pablo Rodríguez Cabal

“True teachers are those who use themselves as bridges over which they invite their students to cross; then, having facilitated their crossing, joyfully collapse, encouraging them to create their own.”

— Nikos Kazantzakis

## **AGRADECIMENTOS**

A mi familia, ¡gracias por tanto apoyo y amor!

A David, ... ¡gracias, gracias, gracias!

Ao Prof. Dr. Julio Zukerman-Schpector e a Profa. Dra. Ignez Caracelli pela acolhida e orientação.

Ao Prof. Dr. Hélio A. Stefani pela colaboração.

Aos meus amigos e colegas no LaCreMM e BioMat: Rui, a Stella e ao Thales.

Ao Prof. Ran Friedman e os colegas e amigos no CCBG na LNU, Kalmar-Suécia.

Um agradecimento especial ao Rui e ao David pela sua valiosa troca de ideias e ajuda na correção ortográfica e sintática da presente tese.

A todos os amigos e pessoas que me apoiaram durante esta jornada.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

## LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

### Códigos de três e uma letra dos 20 aminoácidos comuns

Ala	A	Alanina.	Leu	L	Leucina.
Arg	R	Arginina.	Lys	K	Lisina.
Asn	N	Asparagina.	Met	M	Metionina.
Asp	D	Ácido aspártico.	Phe	F	Fenilalanina.
Cys	C	Cisteína.	Pro	P	Prolina.
Gln	Q	Glutamina.	Ser	S	Serina.
Glu	E	Ácido glutâmico.	Thr	T	Treonina.
Gly	G	Glicina.	Trp	W	Triptofano.
His	H	Histidina.	Tyr	Y	Tirosina.
Ile	I	Isoleucina.	Val	V	Valina.

### Outros

Å	Ångström ( $10^{-10}$ m).
°C	Celsius.
µM	Micromolar ( $10^{-6}$ mol L <sup>-1</sup> )
ADME	Absorção, distribuição, metabolismo e excreção.
CADD	Desenho de fármacos assistido por computador (do inglês, <i>Computer Assisted Drug Design</i> ).
DHODH	Dihidrorotato desidrogenase.
DM	Dinâmica molecular de proteínas.
DP	Desvio padrão.
EC <sub>50</sub>	Concentração efetiva para obtenção da metade do efeito máximo.
FDA	Agência de Controle de Alimentos e Medicamentos dos Estados Unidos de América (do inglês, <i>Food and Drugs Administration</i> ).
FMN	Mononucleotídeo de flavina.
GOLD	<i>Genetic optimization for ligand docking</i> (tradução livre: otimização genética para <i>docking</i> de ligantes).
HB	Ligação de hidrogênio (do inglês, <i>hydrogen bonding</i> ).
IC <sub>50</sub>	Metade da concentração inibitória máxima.
IUPAC	União Internacional de Química Pura e Aplicada (do inglês, <i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i> )
IVS	Triagem virtual inversa (do inglês, <i>inversed virtual screening</i> ).
K	Kelvin.
MEP	Mapa de potencial eletrostático.
NCI	Interações não-covalentes (do inglês, <i>non-covalent interactions</i> ).
h	Horas.
ORO	Orotato.
P.	<i>Plasmodium</i> .
Pf	<i>Plasmodium falciparum</i> .

PM	Plasmepsina.
nm	Nanómetros ( $10^{-9}$ m).
nM	Nanomolar ( $10^{-9}$ mol L <sup>-1</sup> )
ns	Nanosegundos ( $10^{-9}$ s).
NpT	Ensemble isotérmico-isobárico, número de partículas (N), pressão (p) e temperatura (T) constantes.
NVT	Ensemble canônico, número de partículas (N), volume (V) e temperatura (T) constantes.
<i>spp.</i>	Espécies.
PDB	Banco de Dados de Proteínas (do inglês, <i>Protein Data Bank</i> ).
PDB ID	Identificador único de 4 caracteres de cada entrada no PDB. No caso de ligantes (PDB Ligand ID), identificador único de 3 caracteres de pequenas moléculas no PDB.
Rg	Raio de giro.
RMSD	Deslocamento quadrático médio (do inglês <i>root-mean-square deviation</i> ).
t	Tempo.
T	Temperatura.
V	Potencial eletrostático.

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1.1 – Principais famílias de antimaláricos comerciais.....	4
TABELA 1.2 – Viabilidade celular (%) e valores de EC <sub>50</sub> (µM) determinados <i>in vitro</i> para os derivados de indol-3-glioxiltirosina contra o estágio intra-eritrocítico da linhagem 3D7 de <i>P. falciparum</i> . ....	6
TABELA 1.3 – Fármacos aprovados pela FDA até 2017 desenvolvidos com ajuda de métodos CADD. ....	9
TABELA 1.4 – Tipos de interações não-covalentes de caráter atrativo e sua dependência energia–distância.....	21
TABELA 3.1 – Códigos de identificação e nomes IUPAC dos derivados da indol-3-glioxiltirosina.....	25
TABELA 4.1 – Sumário das estruturas de <i>P. falciparum</i> que satisfizeram os critérios de busca definidos no PDB. ....	31
TABELA 4.2 – Códigos de identificação (PDB IDs) e resolução das estruturas da DHODHPf consideradas.....	33
TABELA 4.3 – Valores de RMSD comparativos e pontuações associadas às poses selecionadas para análise após simulações de <i>docking</i> na estrutura da DHODHPf com PBD ID 4ORM. ....	40
TABELA 4.4 – Interações estabelecidas pelos diferentes grupos –R no modo de ligação predito após simulações de <i>docking</i> na estrutura da DHODHPf com PBD ID 4ORM.....	43
TABELA 4.5 – Ocupação no tempo (%) da conformação principal adotada por <b>6a</b> durante as simulações de DM dos complexos DHODHPf <sub>H185-HSE-ORO-FMN-6a</sub> e DHODHPf <sub>H185-HSP-ORO-FMN-6a</sub> .....	48
TABELA 4.6 – Número de contatos ( $d < 4 \text{ \AA}$ ) enzima...ligantes presentes durante as simulações de DM dos complexos DHODHPf <sub>H185-HSE-ORO-FMN-6a</sub> e DHODHPf <sub>H185-HSP-ORO-FMN-6a</sub> .....	49
TABELA 4.7 – Ocupação no tempo (%) das ligações de hidrogênio mais representativas enzima...6a estabelecidas durante as simulações de DM dos complexos DHODHPf <sub>H185-HSE-ORO-FMN-6a</sub> e DHODHPf <sub>H185-HSP-ORO-FMN-6a</sub> .....	49
TABELA 4.8 – Resumo das principais interações não-covalentes, diferentes de ligações de hidrogênio, observadas nas estruturas mais representativas de cada uma das simulações de DM dos complexos DHODHPf <sub>H185-HSE-ORO-FMN-6a</sub> e DHODHPf <sub>H185-HSP-ORO-FMN-6a</sub> .....	50
TABELA 4.9 – Valores de energia livre de hidratação ( $\Delta G_{\text{Hidratação}}$ ) dos derivados do benzeno correspondentes aos grupos –R dos compostos derivados da indol-3-glioxiltirosina (I3GT) <b>6b</b> , <b>6d</b> , <b>6c</b> , <b>6a</b> e <b>6h</b> . ....	50
TABELA 4.10 – Percentagem de identidade entre as sequências das enzimas PMI, PMII, PMIV e HAP de <i>P. falciparum</i> . ....	55



TABELA 4.11 – Códigos de identificação (PDB IDs) e resolução das estruturas das plasmepsinas vacuolares consideradas.....	56
TABELA 4.12 – Valores de pontuação associados às poses selecionadas para análise após simulações de <i>docking</i> na estrutura da PMII com PBD ID 5YIA.....	59
TABELA 4.13 – Ocupação no tempo (%) das ligações de hidrogênio entre a enzima PMII e o composto <b>6a</b> estabelecidas durante as simulações de DM. ....	62
TABELA 4.14 – Ocupação no tempo (%) das ligações de hidrogênio simultâneas entre a enzima PMII e o composto <b>6a</b> estabelecidas durante as simulações de DM. ....	63

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1.1 – Mapa de risco da malária.....	2
FIGURA 1.2 – Ciclo de vida simplificado do <i>Plasmodium spp.</i> no hospedeiro humano. .....	3
FIGURA 1.3 – Fármacos representativos das principais famílias de antimaláricos comerciais. ....	4
FIGURA 1.4 – Derivados de indol-3-glioxiltirosina aqui estudados. ....	6
FIGURA 1.5 – Linha do tempo do processo de descoberta e desenvolvimento de fármacos.....	8
FIGURA 1.6 – Representação esquemática de uma simulação de <i>docking</i> molecular. .....	11
FIGURA 1.7 – Esquematização da técnica de triagem virtual inversa baseada no <i>docking</i> . ....	12
FIGURA 1.8 – Representação esquemática dos diferentes parâmetros considerados na função de energia potencial dos termos ligados nos campos de força. ....	16
FIGURA 1.9 – Ligações de hidrogênio. ....	18
FIGURA 1.10 – Ligações de halogênio. ....	19
FIGURA 1.11 – Interações- $\pi$ .....	20
FIGURA 1.12 – Exemplo da dependência energia–distância das interações não-covalentes. ....	21
FIGURA 1.13 – Identificação de algumas interações não-covalentes que podem ser estabelecidas pelo composto <b>6d</b> . ....	22
FIGURA 3.1 – Modelagem molecular dos compostos.....	26
FIGURA 4.1 – Estrutura tridimensional da DHODHPf.....	35
FIGURA 4.2 – Sítio de ligação dos inibidores na DHODHPf.....	35
FIGURA 4.3 – Ligações de hidrogênio da cadeia lateral da His185 nas estruturas cristalográficas da DHODHPf.....	37
FIGURA 4.4 – Representação espacial das interações não-covalentes entre a His185 e a Phe227/inibidores cristalográficos.....	38
FIGURA 4.5 – Modo de ligação predito para os derivados da indol-3-glioxiltirosina após simulações de <i>docking</i> na estrutura da DHODHPf com PDB ID 4ORM.....	39

- FIGURA 4.6 – Interações não-covalentes, representadas para o composto **6a**, estabelecidas pelo modo de ligação predito após simulações de *docking* dos derivados da indol-3-glioxiltirosina na estrutura da DHODHPf com PDB ID 4ORM. .41
- FIGURA 4.7 – Posicionamento dos grupos –R no modo de ligação predito para os compostos derivados da indol-3-glioxiltirosina após simulações de *docking* na estrutura da DHODHPf com PDB ID 4ORM.....43
- FIGURA 4.8 – Evolução temporal de algumas das características estruturais da DHODHPf nas simulações de DM dos complexos DHODHPf<sub>H185-HSE</sub>-ORO-FMN-**6a** e DHODHPf<sub>H185-HSP</sub>-ORO-FMN-**6a**. ....45
- FIGURA 4.9 – Evolução temporal da estrutura secundária da DHODHPf nas trajetórias independentes obtidas para os complexos DHODHPf<sub>H185-HSE</sub>-ORO-FMN-**6a** e DHODHPf<sub>H185-HSP</sub>-ORO-FMN-**6a** .....45
- FIGURA 4.10 – Evolução temporal dos ligantes ORO e FMN nas simulações de DM dos complexos DHODHPf<sub>H185-HSE</sub>-ORO-FMN-**6a** e DHODHPf<sub>H185-HSP</sub>-ORO-FMN-**6a**. .....46
- FIGURA 4.11 – Distribuições normalizadas dos valores de RMSD registrados para os átomos não-hidrogênios dos ligantes cognato ORO e FMN nas simulações de DM dos complexos DHODHPf<sub>H185-HSE</sub>-ORO-FMN-**6a** e DHODHPf<sub>H185-HSP</sub>-ORO-FMN-**6a**.....47
- FIGURA 4.12 – Evolução temporal dos composto **6a** nas simulações de DM dos complexos DHODHPf<sub>H185-HSE</sub>-ORO-FMN-**6a** e DHODHPf<sub>H185-HSP</sub>-ORO-FMN-**6a**.....48
- FIGURA 4.13 – Estrutura tridimensional da pepsina humana e das plasmepsinas vacuolares de *P. falciparum*. ....53
- FIGURA 4.14 – Alinhamento das sequências das plasmepsinas vacuolares de *P. falciparum*.....54
- FIGURA 4.15 – Estruturas dos inibidores cristalográficos presentes nas estruturas avaliadas das plasmepsinas vacuolares de *P. falciparum*. ....58
- FIGURA 4.16 – Modo de ligação predito para os compostos após simulações de *docking* na estrutura da PMII de *P. falciparum* com PDB ID 5YIA e interações comuns observadas nos complexos obtidos representadas para o composto **6a**. ....60
- FIGURA 4.17 – Evolução temporal de algumas das características estruturais da PMII nas simulações de DM dos complexos PMII-**6a**.....61
- FIGURA 4.18 – Evolução temporal do composto **6a** nas simulações de DM dos complexos PMII-**6a**.....62

## LISTA DE ESQUEMAS

ESQUEMA 1.1 – Integração de métodos CADD ao processo de descoberta e desenvolvimento de fármacos.....	9
ESQUEMA 3.1 – Etapas gerais envolvidas no desenvolvimento do presente trabalho. ....	25
ESQUEMA 4.1 – Reação catalisada pela enzima DHODH <i>Pf</i> na presença do cofator FMN e da coenzima CoQ. ....	32
ESQUEMA 4.2 – Possíveis estados de protonação do aminoácido <i>L</i> - $\alpha$ -histidina a valores de pH próximos ao fisiológico. ....	36
ESQUEMA 4.3 – Esquematização do processo de degradação (catabolismo) da hemoglobina pelo <i>P. falciparum</i> durante o estágio intra-eritrocítico da infecção.....	51
ESQUEMA 4.4 – Possíveis estados de protonação do aminoácido ácido <i>L</i> -aspártico a valores de pH próximos a 4.....	58

## RESUMO

“IDENTIFICAÇÃO ASSISTIDA POR DOCKING MOLECULAR DE POTENCIAIS ALVOS EM *PLASMODIUM FALCIPARUM* PARA DERIVADOS DE INDOL-3-GLIOXILTROSINA COM ATIVIDADE ANTIMALÁRICA *IN VITRO*”

A malária, embora não seja mais considerada uma doença negligenciada, permanece como problema de saúde pública. Somente em 2018, a Organização Mundial da Saúde estimou 228 milhões de novos casos e 405 mil mortes ao redor do mundo. Atualmente, a quimioterapia é a única estratégia disponível para o tratamento desta doença. No entanto, devido ao surgimento de resistência do *Plasmodium spp.* aos antimaláricos disponíveis faz-se necessário e preeminente o desenvolvimento de novos fármacos para tratar a mesma. Neste sentido encontram-se descritos na literatura uma série de derivados de indol-3-glioxiltirosina com atividade antiparasitária *in vitro* frente ao estágio intra-eritrocítico do *Plasmodium falciparum*. Como nos últimos anos os métodos assistidos por computador para o desenvolvimento de medicamentos fizeram grandes avanços, sendo comumente integrados na fase de desenvolvimento pré-clínico, seu uso foi aplicado para tentar desvendar seu mecanismo de ação e/ou alvo biológico. Neste trabalho, empregamos triagem virtual inversa baseada no *docking* molecular para identificar potenciais alvos dos derivados de indol-3-glioxiltirosina. No total, 34 enzimas diferentes do *Plasmodium falciparum*, com estruturas disponíveis no Banco de Dados de Proteínas, foram avaliadas de forma detalhada mediante simulações de *docking* molecular. Em adição, simulações de dinâmica molecular foram empregadas para estudar a estabilidade dos complexos proteína-ligante considerados como promissores. Os resultados apontaram as enzimas de *Plasmodium falciparum* dihidroorotato desidrogenase (DHODH) e plasmepsina II (PMII) como potenciais alvos. As simulações de *docking* mostraram que os compostos mais ativos conseguiriam estabelecer as interações não-covalentes fundamentais para a inibição dos alvos, ou seja, os resultados do *docking* concordam com os valores experimentais de atividade antiparasitária. Já a dinâmica molecular foi utilizada para estudar a estabilidade dos complexos proteína-ligante em uma situação que simula as condições biológicas. Todos estes resultados mostram que a metodologia aqui descrita pode ser empregue na otimização dos derivados de indol-3-glioxiltirosina visando um aumento da sua atividade antiplasmodial.

**Palavras-chave:** Triagem virtual inversa. *Docking*. Malária. Indol-3-glioxiltirosina.

## ABSTRACT

“IDENTIFICATION, ASSISTED BY MOLECULAR DOCKING, OF POTENTIAL TARGETS IN *PLASMODIUM FALCIPARUM* FOR INDOLE-3-GLYOXYL TYROSINE DERIVATIVES WITH *IN VITRO* ANTIMALARIAL ACTIVITY”

Malaria, although it is no longer considered a neglected disease, remains a public health problem. In 2018 alone, the World Health Organization estimated 228 million new cases and 405,000 deaths worldwide. Currently, chemotherapy is the only strategy available for the treatment of this disease. However, the emergence of resistance from *Plasmodium spp.* to the available antimalarials makes it necessary and preeminent to develop new drugs to treat it. In this sense, the *in vitro* activity against *Plasmodium falciparum*, in the intraerythrocytic stage, of a series of indole-3-glyoxyl tyrosine derivatives are described in the literature. As in recent years, computer-aided methods for drug development have made great advances, being commonly integrated into the preclinical development phase, their use was applied to try to unveil their mechanism of action and/or target which is unknown. In this work, we employ inverse virtual screening based on molecular *docking* to identify potential targets for the indole-3-glyoxyl tyrosine derivatives. In total, 34 different enzymes from *Plasmodium falciparum*, with structures available in the Protein Data Bank, were evaluated in detail using molecular *docking* simulations. Besides, molecular dynamics simulations were used to study the stability of the protein-ligand complexes considered to be promising leads. The results indicated the enzymes dihydroorotate dehydrogenase (DHODH) and plasmepsin II (PMII), of *Plasmodium falciparum*, as potential targets. The *docking* simulations showed that the most active compounds would be able to establish the key non-covalent interactions needed for target inhibition, that is, the *docking* results agree with the experimental values of the antiparasitic activity. Molecular dynamics was used to study the stability of protein-ligand complexes in a situation that simulates biological conditions. All of these results show that the methodology described here can be used in the optimization of the indole-3-glyoxyl tyrosine derivatives aiming at increasing their antiplasmodial activity.

**Keywords:** Inverse virtual screening. *Docking*. Malaria. Indole-3-glyoxyl tyrosine.

## SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 – Introdução.....	1
1.1 – Malária.....	1
1.1.1 – Derivados da indol-3-glioxiltirosina com atividade antimalárica <i>in vitro</i> .....	5
1.2 – Desenho de fármacos assistido por computador .....	7
1.2.1 – <i>Docking</i> molecular e triagem virtual inversa baseada no <i>docking</i> .....	10
1.2.1.1 – GOLD, <i>Genetic Optimization for Ligand Docking</i> .....	12
1.2.2 – Pós-processamento de simulações de <i>docking</i> empregando dinâmica molecular .....	14
1.3 – Reconhecimento molecular e interações não-covalentes .....	17
CAPÍTULO 2 – Objetivos .....	24
CAPÍTULO 3 – Materiais e Métodos .....	25
3.1 – Modelagem molecular dos compostos .....	25
3.2 – Busca, seleção e preparação das biomoléculas .....	26
3.3 – <i>Docking</i> molecular .....	27
3.4 – Identificação de interações não-covalentes.....	28
3.5 – Representação espacial de interações não-covalentes .....	28
3.6 – Dinâmica molecular .....	29
CAPÍTULO 4 – Resultados e Discussão .....	31
4.1 – Avaliação da enzima dihidroorotato desidrogenase de <i>P. falciparum</i> .....	32
4.2 – Avaliação das plasmepsinas vacuolares de <i>P. falciparum</i> .....	51
CAPÍTULO 5 – Conclusões e Perspectivas .....	65
CAPÍTULO 6 – Referências .....	67
CAPÍTULO 7 – Apêndices.....	79

# CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO

## 1.1 – Malária

A malária, doença infecciosa febril, embora não seja mais considerada uma doença negligenciada<sup>a</sup>, permanece como problema de saúde pública. Em 2018 foram registrados cerca de 228 milhões de novos casos e 405 mil óbitos ao redor do mundo, números predominantes entre populações negligenciadas (WHO, 2019). A Organização Mundial da Saúde, estimou que a nível mundial não houve uma diminuição significativa na incidência da doença no período 2014-2018. No continente americano, em 2017, registrou-se um aumento no número de casos, principalmente em regiões da Nicarágua, Venezuela e Brasil (WHO, 2018, 2019).

As áreas endêmicas do mosquito *Anopheles spp.*, vetor do agente etiológico da malária, o parasito<sup>b</sup> *Plasmodium spp.*, são as zonas climáticas tropicais e subtropicais. Portanto, aproximadamente a metade da população mundial está sob risco de infecção (Fig. 1.1). Os grupos de risco mais vulneráveis a contrair esta doença são as crianças, as mulheres gestantes, os idosos, os turistas, migrantes e pessoas imunocomprometidas (VERLINDEN; LOUW; BIRKHOLTZ, 2016; WHO, 2019).

---

<sup>a</sup> Segundo a Organização Mundial da Saúde, em 2020, são doenças tropicais negligenciadas (DTNs): i) úlcera de Buruli, ii) doença de Chagas, iii) dengue e chikungunya, iv) dracunculíase (doença do verme-da-guiné), v) equinococose, vi) trematodíases alimentares, vii) tripanossomíase africana (doença do sono), viii) leishmaniose, ix) hanseníase (lepra), x) filaríase linfática, xi) micetoma, cromoblastomicose e “outras micoses profundas”, xii) oncocercose (cegueira dos rios), xiii) raiva, xiv) sarna e outras doenças causadas por ectoparasitos, xv) esquistossomose, xvi) verminose por contato com solo contaminado, xvii) envenenamento por picada de cobra, xviii) teníase/cisticercose, xix) tracoma e xx) bejel, pinta e boubá (treponematoses endêmicas). Este grupo diversificado de doenças transmissíveis não recebe a devida atenção no atendimento médico, no desenvolvimento de fármacos e no desenvolvimento de métodos diagnósticos. As mesmas prevalecem em 149 países, nas regiões climáticas tropicais e subtropicais, afetando mais de um bilhão de pessoas. As populações mais afetadas são aquelas vivendo na pobreza, sem saneamento adequado e em contato direto com vetores infecciosos e animais domésticos e pecuários. A cada ano, as DTNs custam bilhões de dólares às economias em desenvolvimento (WHO, 2020).

<sup>b</sup> A Sociedade Brasileira de Parasitologia recomenda o uso do termo parasito para se referir ao ser vivo de menor porte que vive associado a outro ser vivo de maior porte, à custa ou na dependência deste (SOCIEDADE BRASILEIRA DE PARASITOLOGIA, [s.d.]).



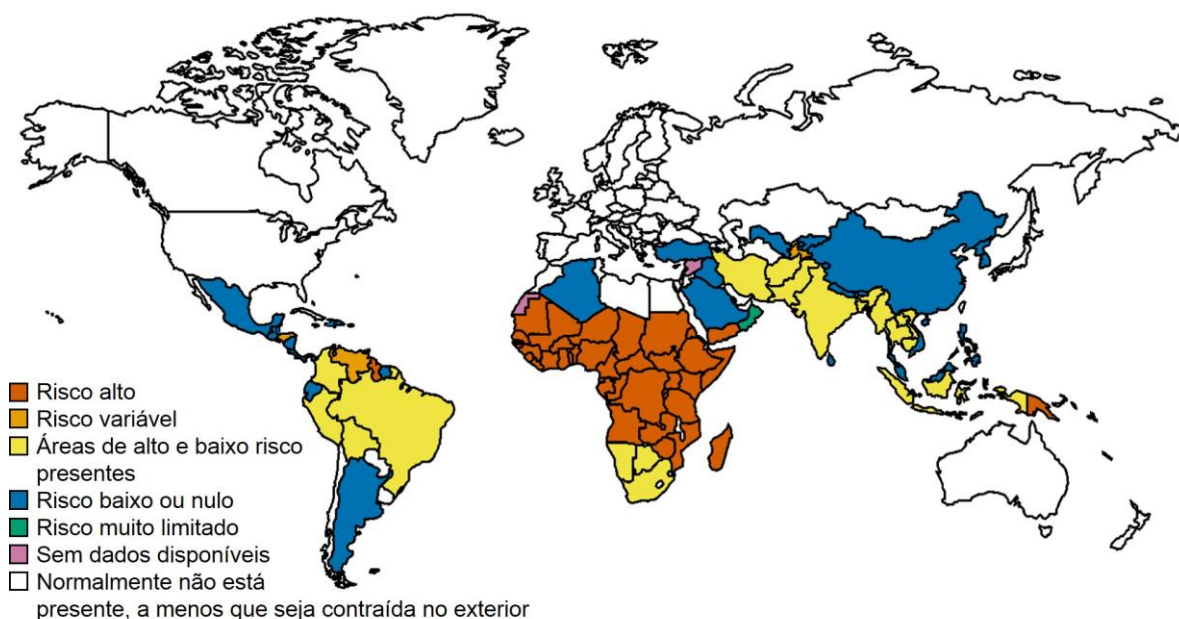


FIGURA 1.1 – Mapa de risco da malária.

Fonte: elaborada pela autora com base em HR HEALTHCARE LTD., 2020.

A principal via de contágio no ser humano é pela picada de uma fêmea do mosquito *Anopheles spp.* infectada com o parasito. Após contágio, a infecção se desenvolve em duas fases, a hepática e a sanguínea (Fig. 1.2). Os diferentes sintomas clínicos são só observados durante o estágio intra-eritrocítico da fase sanguínea. Neste estágio, os parasitos invadem os glóbulos vermelhos (eritrócitos), degradam a hemoglobina para se nutrir e se reproduzem assexuadamente. Como consequência, ocorre a lise celular e se libera na corrente sanguínea a hemozoína, conhecida coloquialmente como pigmento malárico. A hemozoína é o produto da biocristalização do grupo heme, tóxico para o parasito, pelo *Plasmodium spp.* (DHANGADAMAJHI; KAR; RANJIT, 2010; LANG-UNNASCH; MURPHY, 1998).

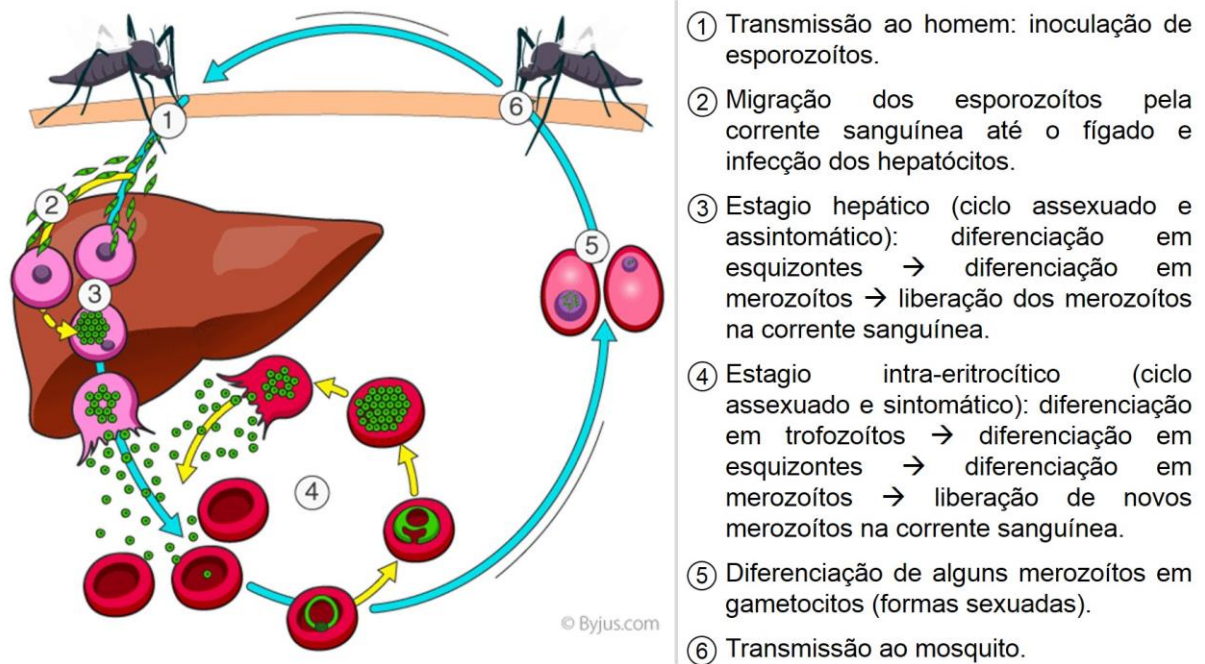


FIGURA 1.2 – Ciclo de vida simplificado do *Plasmodium spp.* no hospedeiro humano.  
 Fonte: figura tomada e adaptada com fins acadêmicos de BYJU'S, 2020.

A duração e recorrência dos sintomas (calafrios, febre e sudorese, podendo estar acompanhados, ou não, por dores de cabeça, dores musculares, fadiga, náuseas, vômitos e diarreia) depende da espécie do parasito causante da infecção. Cinco espécies diferentes de *Plasmodium* podem infectar humanos: *P. falciparum* (prevalente na África, no sudeste asiático, no mediterrâneo oriental e no pacífico ocidental), *P. vivax* (prevalente na América), *P. malariae* (de baixa prevalência, presente na África subsaariana, no sudeste asiático, no pacífico ocidental e na bacia amazônica), *P. ovale* (de baixa prevalência, presente na África subsaariana, no sudeste asiático e no pacífico ocidental) e *P. knowlesi* (presente no sudeste asiático) (COLLINS, 2012; MUELLER; ZIMMERMAN; REEDER, 2007; WHO, 2019). As complicações da malária que podem levar ao óbito, na ausência de tratamento oportuno, são anemia severa, malária cerebral, edemas pulmonares, insuficiência renal e/ou hepática e hipoglicemia (RUIZ LOPEZ DEL PRADO et al., 2014; VAN VUGT et al., 2011).

A quimioterapia constitui a única estratégia atualmente viável para o tratamento da malária. No entanto, o *Plasmodium spp.*, principalmente *P. falciparum*, responsável pelas formas mais letais da doença, tem desenvolvido resistência aos

fármacos disponíveis no mercado<sup>c</sup> os quais, na sua grande maioria, atuam durante o estágio intra-eritrocítico da infecção (Tabela 1.1, Fig. 1.3) (BIRKHOLTZ et al., 2012; BLASCO; LEROY; FIDOCK, 2017; LALLOO et al., 2016; LENGELER, 2004; TSE; KORSIK; TODD, 2019; VERLINDEN; LOUW; BIRKHOLTZ, 2016; WHO, 2018).

TABELA 1.1 – Principais famílias de antimaláricos comerciais.

Família de fármacos	Fármaco representativo	Mecanismo de ação / alvo no parasito	Estágio de atuação
Aminoquinolinas	Cloroquina <sup>†</sup>	Interferência na formação da hemozoína	Intra-eritrocítico
Aminoálcoois	Mefloquina	Complexo tóxico com o grupo heme <sup>††</sup>	Intra-eritrocítico
Antifolatos	Sulfadoxina	Inibição da enzima dihidropteroato sintase do <i>Plasmodium</i>	Intra-eritrocítico/ Hepático
	Pirimetamina	Inibição da enzima dihidrofolato redutase do <i>Plasmodium</i>	Intra-eritrocítico/ Hepático
Naftoquinonas	Atovaquona	Complexo com citocromo <i>bc<sub>1</sub></i> do <i>Plasmodium</i> <sup>†</sup>	Intra-eritrocítico/ Hepático
Endoperóxidos	Artemisina	Formação de espécies reativas de oxigênio (ERO) / Alquilação do grupo heme	Intra-eritrocítico

<sup>†</sup> A cloroquina é usada como uma mistura racêmica. <sup>††</sup> O mecanismo de ação exato ainda precisa ser elucidado.

Fonte: elaborada pela autora com base em TSE; KORSIK; TODD, 2019 e VERLINDEN; LOUW; BIRKHOLTZ, 2016.

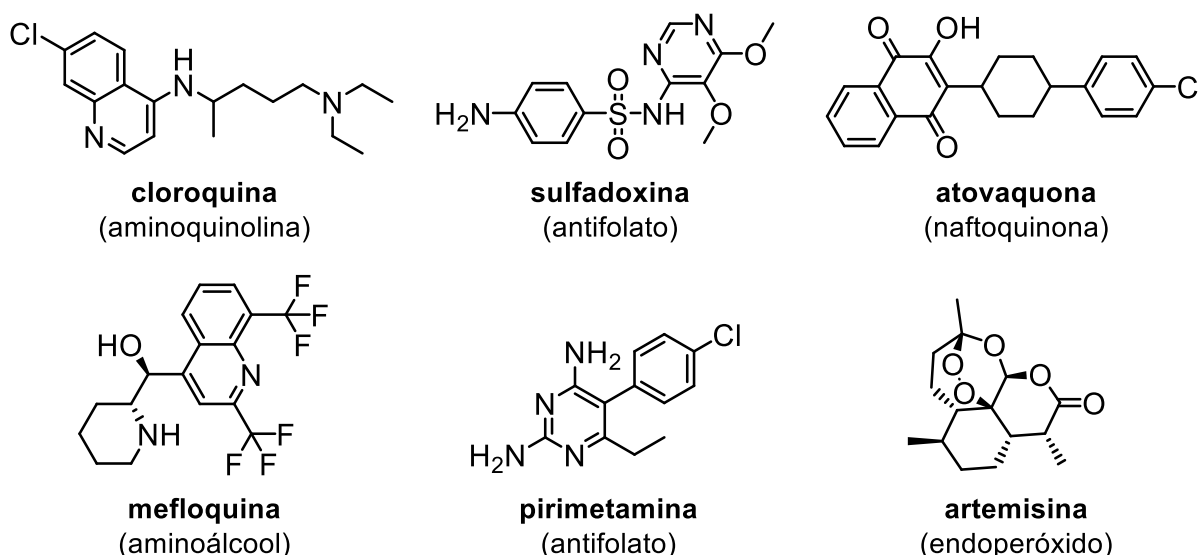


FIGURA 1.3 – Fármacos representativos das principais famílias de antimaláricos comerciais.

Fonte: elaborada pela autora com base em TSE; KORSIK; TODD, 2019 e VERLINDEN; LOUW; BIRKHOLTZ, 2016.

<sup>c</sup> Na atualidade, não há relatórios de resistência contra o fármaco tafenoquina, aprovado pela agência para a Administração de Alimentos e Medicamentos dos Estados Unidos (FDA, do inglês *Food and Drugs Administration*) em julho de 2018. A tafenoquina está indicada como agente quimiopreventivo de todas as formas de malária e para o tratamento após infecção por *P. vivax* (HOUNKPATIN; KREIDENWEISS; HELD, 2019).

Em adição, o uso dos mesmos pode causar efeitos secundários graves (e.g. alterações cardíacas e da visão no caso da cloroquina ou dano permanente do sistema nervoso central no caso da mefloquina), consequência de interações com alvos secundários (os denominados *off-targets*) não desejadas. Assim, é necessário o desenvolvimento de novos compostos antimaláricos que possam ser administrados isolados ou em combinação com outros fármacos e que apresentem, além de baixa toxicidade, i) diferenciação química dos já existentes; ii) alvo(s) conhecido(s) antes dos ensaios clínicos; iii) novas entidades/processos bioquímicos como alvos e iv) uma cura radical<sup>d</sup> após uma única exposição (TSE; KORSIK; TODD, 2019; VERLINDEN; LOUW; BIRKHOLTZ, 2016).

### 1.1.1 – Derivados da indol-3-glioxiltirosina com atividade antimalárica *in vitro*

Mediante o ensaio *in vitro* SYBR *Green* I de células inteiras<sup>e</sup>, o Prof. Dr. Hélio A. Stefani<sup>f</sup> e colaboradores identificaram derivados de indol-3-glioxiltirosina com atividade antimalárica frente a linhagem 3D7<sup>g</sup> de *P. falciparum*. Da série sintetizada (Fig. 1.4, enantiômeros S), os compostos **6b** e **6d** consideraram-se promissores já que diminuíram em mais de 85% a parasitemia relativa<sup>h</sup> após exposição a uma concentração 25 µM dos mesmos, exibindo valores de EC<sub>50</sub><sup>i</sup> na faixa 0,2–4,8 µM (Tabela 1.2). Em adição, **6b** e **6d** mostraram-se não-citotóxicos frente à linhagem

---

<sup>d</sup> Os Centros de Controle e Prevenção de Doenças (CDC, do inglês *Centers for Disease Control and Prevention*) especificam que o termo cura radical corresponde à completa eliminação dos parasitos *Plasmodium* do corpo. O termo aplica-se especificamente à eliminação do estágio de dormência no fígado (hipnozoítos) após infecção com *P. vivax* e/ou *P. ovale*.

<sup>e</sup> Ensaio de correlação de fluorescência no que se detecta a presença de ADN, neste caso do *P. falciparum*, em eritrócitos infectados como uma medida i) do crescimento e propagação do parasito ou ii) da inibição do crescimento do mesmo por compostos com atividade antimalárica (CHIBA et al., 2010).

<sup>f</sup> Professor titular do Departamento de Farmácia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (FCF-USP).

<sup>g</sup> Linhagem africana de *P. falciparum* cloroquina-sensível amplamente utilizada em ensaios *in vitro* (SU, 2014; WALLIKER et al., 1987).

<sup>h</sup> Número de parasitos normalizado em relação ao controle com células infectadas expostas a uma concentração equivalente do solvente dimetilsulfóxido (DMSO) (VASCONCELOS et al., 2019).

<sup>i</sup> Concentração efetiva para obtenção da metade do efeito máximo (PROUDFOOT et al., 2011). Neste caso, diminuir em 50% a parasitemia relativa.

celular hepática humana HepG2<sup>j</sup> no ensaio *in vitro* de viabilidade celular WST-1<sup>k</sup> (VASCONCELOS et al., 2019).

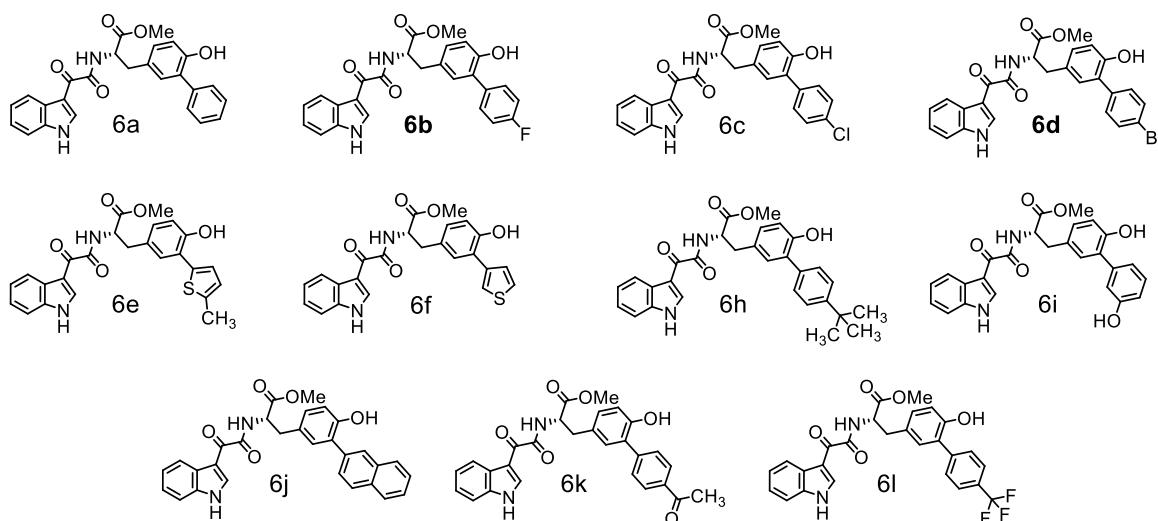


FIGURA 1.4 – Derivados de indol-3-glioxiltirosina aqui estudados.

Fonte: elaborada pela autora com base em VASCONCELOS et al., 2019.

TABELA 1.2 – Viabilidade celular (%) e valores de EC<sub>50</sub> (μM) determinados *in vitro* para os derivados de indol-3-glioxiltirosina contra o estágio intra-eritrocítico da linhagem 3D7 de *P. falciparum*.

Composto	Viabilidade (%) <sup>†</sup>			EC <sub>50</sub> (μM) <sup>††</sup>
	25 μM	50 μM	100 μM	
6a	21,1 ± 1,9	9,0 ± 0,6	3,1 ± 1,3	--
6b	7,0 ± 0,9	3,9 ± 0,9	1,8 ± 0,5	1,3 ± 1,1
6c	19,4 ± 3,8	13,0 ± 2,3	8,6 ± 1,7	--
6d	13,0 ± 7,5	7,5 ± 2,9	1,9 ± 0,6	3,7 ± 1,1
6e	26,7 ± 5,4	10,1 ± 1,7	7,6 ± 1,6	--
6f	29,8 ± 2,8	9,9 ± 0,8	5,8 ± 0,9	--
6h	27,2 ± 5,7	8,2 ± 1,8	5,0 ± 1,2	--
6i	33,2 ± 1,4	11,1 ± 1,4	9,2 ± 2,3	--
6j	24,9 ± 5,3	10,7 ± 2,1	8,5 ± 1,7	--
6k	23,2 ± 3,9	13,9 ± 2,3	10,2 ± 1,1	--
6l	20,4 ± 2,9	11,4 ± 0,6	5,1 ± 0,8	--

<sup>†</sup>Tempo de exposição: 96 h; temperatura: 37 °C; referência: eritrócitos saudáveis e eritrócitos infectados sem exposição aos compostos.

<sup>††</sup>Valores determinados unicamente para os compostos considerados como promissores.

Valores de EC<sub>50</sub> (μM) na linhagem 3D7 de alguns fármacos comerciais apresentados na literatura: cloroquina, 0,003; mefloquina, 0,02; sulfadoxina, 0,03; pirimetamina, 0,0072; atovaquona, 0,0004 e artemisina, 0,01.

Fonte: elaborada pela autora com base em DENG et al., 2010; HAIN et al., 2014; PLOUFFE et al., 2008; SANTOS et al., 2015 e VASCONCELOS et al., 2019.

<sup>j</sup> Linhagem imortal de hepatocarcinoma humano que constitui um modelo economicamente acessível para os estudos exploratórios de metabolismo e toxicidade hepática de pequenas moléculas (ALBRECHT et al., 2019).

<sup>k</sup> Ensaio espectrofotométrico (de correlação de absorvância) no qual se determina a atividade metabólica da célula, amplamente dependente da produção glicolítica de NAD(P)H em células viáveis (YIN et al., 2013).

Em vista dos resultados obtidos, **6b** e **6d** consideraram-se *hits*<sup>l</sup> para o desenho de novos antimaláricos. No entanto, seu mecanismo de ação permanece desconhecido, sendo preciso identificar um potencial alvo (receptor) no *P. falciparum* que permita sua posterior otimização.

## 1.2 – Desenho de fármacos assistido por computador

O desenho de fármacos assistido por computador (CADD, do inglês *computer-aided drug design*) “envolve todas as técnicas assistidas por computador empregadas para descobrir, projetar e otimizar compostos biologicamente ativos a fim de serem administrados como fármacos” (VAN DE WATERBEEMD et al., 1997). Exemplos de métodos CADD são o *docking* molecular, a dinâmica molecular, o desenho *de novo* de ligantes, o mapeamento de pontos farmacofóricos, a construção de modelos de relação quantitativa estrutura-atividade (QSAR, do inglês *quantitative structure-activity relationship*) e a modelagem de estruturas proteicas por homologia (BIOINFORMATICS, [s.d.]; LEELANANDA; LINDERT, 2016; SLIWOSKI et al., 2014).

As diferentes técnicas de CADD são usualmente integradas à *pipeline* de desenvolvimento de fármacos durante as etapas de descoberta de candidatos e de desenvolvimento pré-clínico (Figs. 1.5 e Esquema 1.1) permitindo assistir a identificação e validação de alvos moleculares; aumentar a taxa de identificação de moléculas *hit*; orientar os processos de otimização *hit-to-lead* e do *lead*<sup>m</sup> e/ou estimar propriedades de adsorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade (BIOINFORMATICS, [s.d.]; LEELANANDA; LINDERT, 2016; SLIWOSKI et al., 2014). Exemplos de fármacos comerciais desenvolvidos com ajuda de técnicas CADD são apresentados na Tabela 1.3.

---

<sup>l</sup> *Hit*: “molécula de estrutura conhecida com uma atividade reproduzível acima de um limite definido num ensaio biológico” (FULTON, 2014).

<sup>m</sup> *Lead*: “Composto que satisfaz critérios mínimos predefinidos para uma otimização adicional de estrutura e atividade” (FULTON, 2014).

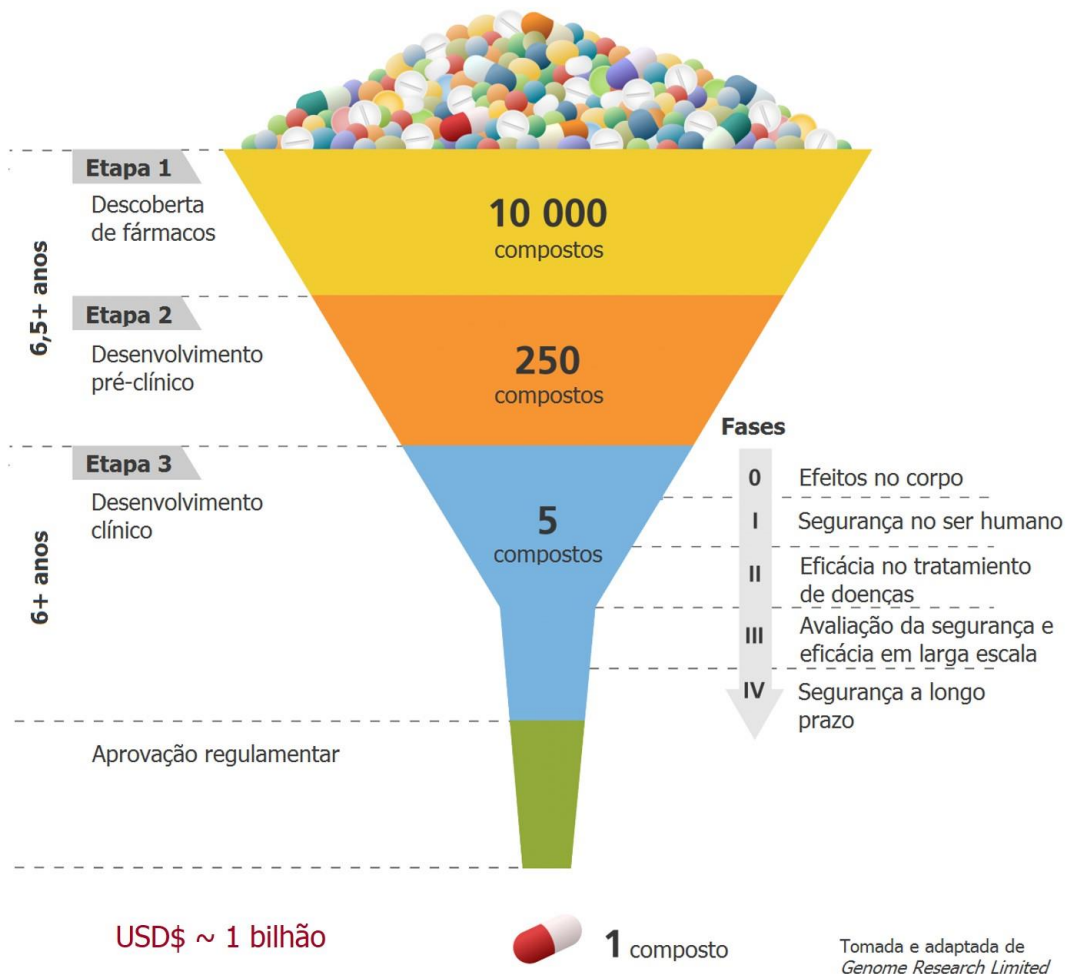
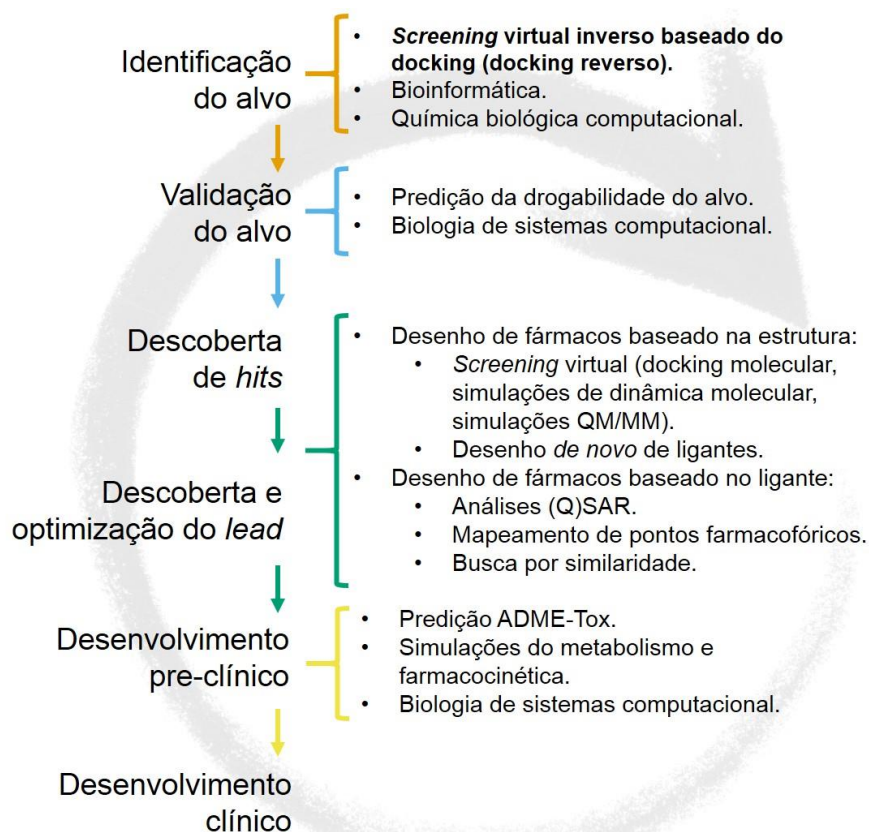


FIGURA 1.5 – Linha do tempo do processo de descoberta e desenvolvimento de fármacos.  
 Fonte: figura tomada e adaptada com fins acadêmicos de GENOME RESEARCH LIMITED, 2016.



ESQUEMA 1.1 – Integração de métodos CADD ao processo de descoberta e desenvolvimento de fármacos. A seta circular reflete o caráter iterativo do processo.

Fonte: elaborada pela autora com base em HOQUE et al., 2017.

TABELA 1.3 – Fármacos aprovados pela FDA até 2017 desenvolvidos com ajuda de métodos CADD.

Aprovação	Fármaco	Alvo principal	Tratamento / Uso Primário
1981	Captopril	Enzima conversora da angiotensina	Hipertensão
1986	Norfloxacino	DNA girase (bacteriana)	Infecções bacterianas do trato urinário
1994	Dorzolamida	Anidrase carbônica	Glaucoma
1995	Losartan	Receptores de angiotensina II	Hipertensão
1995	Saquinavir	Protease VIH-1	Terapia anti-HIV
1996	Indinavir	Protease VIH-1	Terapia anti-HIV
1996	Ritonavir	Protease VIH-1	Terapia anti-HIV
1997	Nelfinavir	Protease VIH-1	Terapia anti-HIV
1998	Tirofiban	Glicoproteína IIB/IIIA	Antiplaquetario
1999	Amprenavir	Protease VIH-1	Terapia anti-HIV
1999	Zanamivir	Neuraminidase (viral)	Influenza A e B
2002	Valsartan	Receptores de angiotensina II	Hipertensão
2003	Enfuvirtide	Glucoproteínas gp120 e gp41 (virais)	Terapia anti-HIV
2003	Zolmitriptano	Receptor 5HT1D	Antienxaquecoso
2006	Sunitinib	Receptor tirosina quinase	Carcinoma de células renais
2007	Aliskiren	Renina	Hipertensão
2007	Nilotinib	Tirosina quinase BCR-ABL1	Leucemia mieloide crônica
2011	Crizotinib	Quinase do linfoma anaplásico Proteína tirosina quinase proto-oncogênica ROS1	Carcinoma de pulmão de células não pequenas
2011	Rilpivirina	RT VIH-1	Terapia anti-HIV

(continúa)



(Continuação)

Aprovação	Fármaco	Alvo principal	Tratamento / Uso Primário
2016	Grazoprevir	Proteasa NS3/4a	Hepatites vírus C
2016	Rucaparib	PARP	Câncer de ovário
2017	Betrixaban	Factor Xa	Tromboembolismo venoso
2017	Brigatinib	Quinase do linfoma anaplásico Receptor do fator de crescimento epidérmico	Carcinoma de pulmão de células não pequenas
2017	Vaborbactam	Enzimas $\beta$ -lactamase (bacterianas)	Infecções bacterianas do trato urinário e pielonefrite

Fonte: elaborada pela autora com base em ATHANASIOU; COURNIA, 2018.

### 1.2.1 – *Docking* molecular e triagem virtual inversa baseada no *docking*

A técnica de *docking* molecular tem como intuito prever o melhor encaixe de uma pequena molécula (denominada ligante) num receptor considerando a sua complementaridade química, eletrostática e espacial. Para isto, é preciso conhecer as estruturas tridimensionais tanto do ligante como do(s) sítio(s) de ligação de interesse no receptor, uma biomolécula que pode ser uma proteína ou um ácido nucléico (MORRIS; LIM-WILBY, 2008).

Durante uma simulação de *docking* molecular, os graus de liberdade rotacionais, translacionais e conformacionais do ligante são explorados dentro do sítio de ligação definido. A flexibilidade do receptor pode ser tratada empregando diferentes abordagens. Dentre as mais comuns estão i) considerá-lo como um corpo rígido (abordagem mais usada devido seu baixo custo computacional); ii) empregar um conjunto de estruturas do mesmo receptor com diferentes conformações do sítio de ligação a ser explorado (as quais podem ser obtidas mediante simulações de dinâmica molecular na ausência de um set diverso de estruturas determinadas experimentalmente) ou iii) considerar uma flexibilidade parcial do mesmo, permitindo a rotação e torsão das cadeias laterais de resíduos de interesse (DE VIVO et al., 2016; SALMASO; MORO, 2018).

O resultado de uma simulação de *docking* molecular é um conjunto de poses da pequena molécula avaliada. Uma pose descreve a posição, conformação e orientação predita para o ligante dentro do sítio de ligação explorado. A cada pose está associado um valor de pontuação, o qual é uma estimativa da qualidade (aptidão) da mesma (Fig. 1.6) (MORRIS; LIM-WILBY, 2008; TAYLOR; JEWSEBURY; ESSEX, 2002). Cabe ao pesquisador determinar qual pose do conjunto total obtido representa o modo de ligação mais viável do ligante ao receptor. A seleção da mesma não

depende apenas dos valores de pontuação, sendo necessária uma análise que considere a relevância estatística da pose (a mesma pertence a um cluster de poses com uma população significativa?), a literatura, os dados estruturais disponíveis e se as ligações covalentes<sup>n</sup> e as interações não-covalentes<sup>o</sup> mais importantes para a formação de um complexo estável com o receptor foram satisfeitas (MAKENENI; THIEKER; WOODS, 2018; MORRIS; LIM-WILBY, 2008; RADOUX et al., 2016; RAMÍREZ; CABALLERO, 2018).

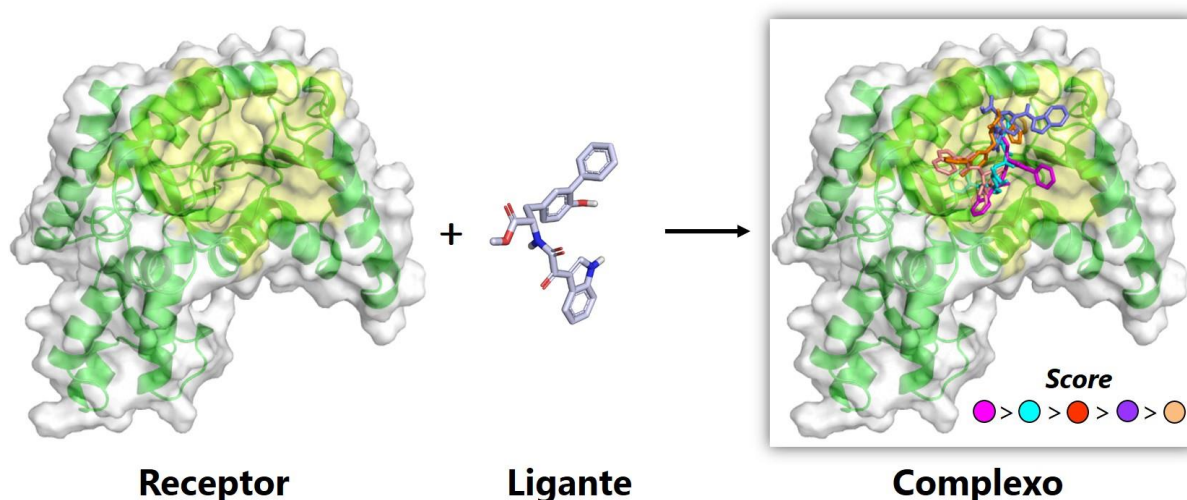


FIGURA 1.6 – Representação esquemática de uma simulação de *docking* molecular. Em amarelo, destaca-se o sítio de ligação explorado.  
Fonte: elaborada pela autora.

Como apresentado no Esquema 1.1, dentre as abordagens *in silico* disponíveis para a identificação de alvos moleculares está a triagem virtual inversa (IVS, do inglês *inversed virtual screening*) baseada no *docking*, também chamado de *docking* inverso ou *docking* reverso<sup>p</sup> (LEE; LEE; KIM, 2016; XU; HUANG; ZOU, 2018). No IVS baseado no *docking*, modela-se o encaixe de uma pequena molécula de interesse num conjunto de diversos receptores a fim de identificar um subconjunto de potenciais alvos para a mesma (Fig. 1.7). Assim, além da identificação de alvos, as aplicações deste método incluem, entre outros, o estudo de reposicionamento de fármacos e a exploração de efeitos secundários e de toxicidade de compostos (XU; HUANG; ZOU, 2018).

<sup>n</sup> Quando pertinente, é dizer, no estudo de ligantes irreversíveis.

<sup>o</sup> As interações não-covalentes são introduzidas na subseção 1.1.3.

<sup>p</sup> O enfoque 'clássico' da triagem virtual é o de efetuar simulações de *docking* de diferentes pequenas moléculas num único receptor de interesse.

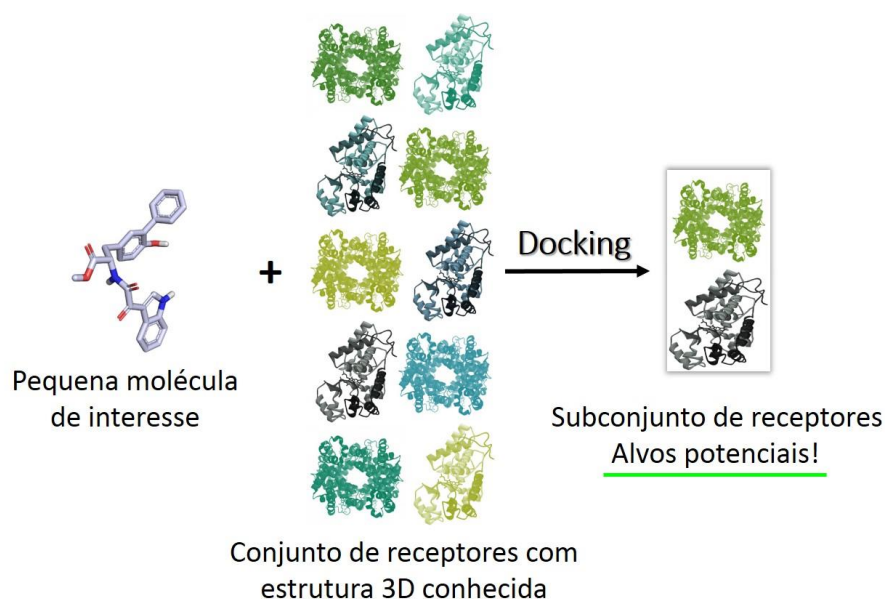


FIGURA 1.7 – Esquemática da técnica de triagem virtual inversa baseada no *docking*.  
Fonte: elaborada pela autora.

A implementação da triagem virtual inversa já permitiu: identificar alvos dos compostos acteosida, quercetin e epigallocatecina-3 galato, derivados de fitoterápicos tradicionais chineses (ZHANG et al., 2019); que os compostos xanthumol e isoxanthumol, produtos naturais com atividade antioxidativa, apresentam atividade inibitória frente às quinases PDK1 e PKC, as quais desempenham um papel fundamental na progressão de tumores (LAURO et al., 2012); a otimização de um receptor sintético baseado na  $\beta$ -ciclodextrina especificamente adaptado para a solubilização do fármaco camptotecina (STEFFEN et al., 2007) e a correta identificação das macromoléculas estreptavidina, receptor de estrogênio- $\alpha$ , adenosina deaminasa e dihidrofolato reductasa como os alvos das pequenas moléculas biotina, 4-hidroxi-tamoxifeno, 6-hidroxi-1,6-dihidropurina ribonucleosido e metotrexato, respectivamente (PAUL et al., 2004).

### 1.2.1.1 – GOLD, *Genetic Optimization for Ligand Docking*

Dentre as mais de 50 opções disponíveis para executar simulações de *docking* molecular (BIOINFORMATICS, [s.d.]) destaca-se o *software* GOLD. GOLD, acrônimo de *Genetic Optimization for Ligand Docking*, demonstrou ser capaz de prever com maior exatidão o modo de ligação de diferentes pequenas moléculas

num conjunto diverso de receptores<sup>9</sup> (COLE et al., 2005; FAN; FU; ZHANG, 2019; JONES et al., 1997; JONES; WILLETT; GLEN, 1995; KELLENBERGER et al., 2004; PAGADALA; SYED; TUSZYNSKI, 2017; TAO et al., 2020; WANG et al., 2016; YURIEV; RAMSLAND, 2013), o que constitui uma vantagem para executar IVS baseado no *docking*.

GOLD emprega um algoritmo genético (método estocástico inspirado na biologia evolutiva) baseado no modelo de ilhas para a geração das poses e atribui os tipos de átomos e ligações segundo a notação SYBYL. Os três operadores que emprega durante a aplicação do algoritmo genético são: recombinação ( $A + B \rightarrow C$ ), mutação ( $A \rightarrow B$ ) e migração entre ilhas vizinhas. O processo pode ser resumido nas seguintes etapas (JONES et al., 1997):

1. Atribuição dos pesos aos operadores recombinação e mutação. O operador migração está configurado para que ocorra cerca de 5% do tempo.
2. Geração aleatória da população inicial de poses nas diferentes ilhas.
3. Avaliação das poses das populações iniciais (atribuição das pontuações).
4. Escolha do operador a ser aplicado empregando o método da roleta.
5. Escolha das poses iniciais onde será aplicado o operador empregando o método da roleta (a escolha de poses com as melhores pontuações é a favorecida).
6. Aplicação do operador e geração de novas poses.
7. Avaliação das novas poses geradas (atribuição das pontuações).
8. Substituição das poses com os menores valores de pontuação da população pelas novas poses, se as mesmas estiverem melhor classificadas e ainda não estiverem presentes na população.
9. Repetição dos passos 4–8 até alcançar o número de operações especificadas ao iniciar o algoritmo genético.

Desde a versão GOLD 5.1, ChemPLP é a função de aptidão padrão para a atribuição das pontuações. ChemPLP é uma função de pontuação empírica adimensional que tem demonstrado ser “geralmente mais eficaz do que outras funções de pontuação, tanto para previsão do modo de ligação quanto para a triagem virtual” (CCDC SOFTWARE, 2018). A mesma corresponde a soma de diferentes funções (Eq. 1):

---

<sup>9</sup> Tomam-se como referência estruturas determinadas por difração de raio-X de complexos receptor-pequena molécula avaliada.

$$f_{ChemPLP} = f_{PLP} + f_{chem-hb} + f_{chem-cho} + f_{chem-met} + f_{lig-clash} + f_{lig-tors} + f_{chem-cov} + f_{chem-prot} + f_{cons} \quad (1)$$

Onde cada termo considera:

- A complementaridade estérica entre o receptor e o ligante empregando um potencial linear em trechos (PLP do inglês, *piecewise linear potential*). Este termo modela as interações de van der Waals e as interações repulsivas.
- A capacidade de estabelecer ligações de hidrogênio ( $f_{chem-hb} + f_{chem-cho}$ ) e metálicas ( $f_{chem-met}$ ) receptor-ligante, considerado distâncias e ângulos.
- O potencial intramolecular de *clash* do ligante ( $f_{lig-clash}$ ).
- O potencial de torção do ligante ( $f_{lig-tors}$ ).
- A formação de ligações covalentes receptor-ligante ( $f_{chem-cov}$ ).
- A flexibilidade do receptor ( $f_{chem-prot}$ ).
- Moléculas de água explícitas e/ou restrições ( $f_{cons}$ ) (CCDC SOFTWARE, 2018; KORB; STÜTZLE; EXNER, 2009).

### 1.2.2 – Pós-processamento de simulações de *docking* empregando dinâmica molecular

A dinâmica molecular (DM) é uma técnica computacional que permite simular o comportamento de um sistema no decorrer do tempo. A mesma está fundamentada nos princípios da mecânica clássica. Portanto, considera as moléculas como conjuntos de partículas unidos por forças harmônicas ou elásticas, cujas interações podem ser descritas pela segunda lei de Newton (ALLEN, 2004; DE VIVO et al., 2016; MURA; MCANANY, 2014) (Eq. 2):

$$\mathbf{f}_i(t) = m_i \mathbf{a}_i(t) \quad (2)$$

Onde, no tempo  $t$ ,  $\mathbf{f}_i$  é a força resultante na  $i$ -ésima partícula de massa  $m_i$  e  $\mathbf{a}_i$ , a aceleração da mesma. A força resultante também pode ser escrita como o gradiente da energia potencial (Eq. 3):

$$\mathbf{f}_i(t) = -\nabla U(\mathbf{r}_i(t)) \quad (3)$$

Onde  $U(\mathbf{r}_i(t))$ , é a energia potencial de interação da  $i$ -ésima partícula com as partículas restantes no tempo  $t$ . O anterior é só possível assumindo que a energia potencial é aditiva (BINDER et al., 2004). A energia total do sistema está dada pelas interações intra- e intermoleculares por meio do chamado campo de força. Um campo de força representa o conjunto de potenciais de interação em um sistema de partículas, átomos em nosso caso. Assim, este descreve as propriedades mecânicas e geométricas derivadas dos parâmetros ligados e não-ligados do sistema (NAMBA; SILVA; SILVA, 2008) (Eq. 4):

$$U_{total}(\mathbf{r}_i(t)) = U(\mathbf{r}_i(t))_{ligados} + U(\mathbf{r}_i(t))_{n\tilde{a}o-ligados} \quad (4)$$

Os parâmetros ligados modelam as ligações covalentes (Eq. 5) enquanto que, os não-ligados, as interações de van der Waals e eletrostáticas (Eq. 6), como representado a continuação:

$$U(\mathbf{r}_i(t))_{ligados} = \sum_{\substack{\text{Comprimentos} \\ \text{de ligação}}} k_b(b - b_0)^2 + \sum_{\substack{\text{\AA ngulos} \\ \text{de ligação}}} k_\theta(\theta - \theta_0)^2 + \sum_{\substack{\text{Dihedros} \\ \text{pr\u00f3prios}}} k_\phi(1 + \cos(n\phi - \delta)) + \sum_{\substack{\text{Dihedros} \\ \text{impr\u00f3prios}}} k_\omega(\omega - \omega_0)^2 \quad (5)$$

$$U(\mathbf{r}_i(t))_{n\tilde{a}o-ligados} = \underbrace{\epsilon \left[ \left( \frac{R_{min,ij}}{r_{ij}} \right)^{12} - \left( \frac{R_{min,ij}}{r_{ij}} \right)^6 \right]}_{\text{van der Waals}} + \underbrace{\frac{q_i q_j}{4\pi\epsilon_0 r_{ij}}}_{\text{eletrost\u00e1ticas}} \quad (6)$$

Na Eq. 5,  $k_b$  é a constante de força da ligação;  $b - b_0$ , a variação do comprimento da ligação entre dois átomos em relação ao seu valor anterior;  $k_\theta$  a constante da força angular;  $\theta - \theta_0$ , a variação do ângulo formado por três átomos em relação ao seu valor anterior;  $k_\phi$ , a constante de força dos ângulos diédricos ou de torção;  $n$ , a multiplicidade da função;  $\phi$ , o ângulo diédrico;  $\delta$ , a mudança de fase;  $k_\omega$ , a constante de força dos diedros impr\u00f3prios e  $\omega - \omega_0$ , o ângulo formado pela variação do plano formado por quatro átomos em relação de sua posição anterior. Os diferentes parâmetros podem ser observados na Fig. 1.8. Na Eq. 6, o primeiro termo representa as interações de van der Waals, e o segundo, as eletrostáticas. As interações de van

der Waals são representadas por um potencial de Lennard-Jones, onde o termo elevado à 12 representa as interações repulsivas e o termo elevado à 6, representa as interações atrativas;  $\epsilon$  é o tamanho do poço do potencial de Lennard-Jones;  $r_{ij}$ , a distância entre dois átomos não ligados e  $R_{min_{ij}}$ , o raio no qual a função de Lennard-Jones é igual a zero. No termo que representa as interações eletrostáticas,  $q_i$  e  $q_j$ , a carga de cada átomo não ligado e  $\epsilon_0$ , a permitividade ou permissividade elétrica no vácuo (ALLEN, 2004; DE VIVO et al., 2016; MURA; MCANANY, 2014).

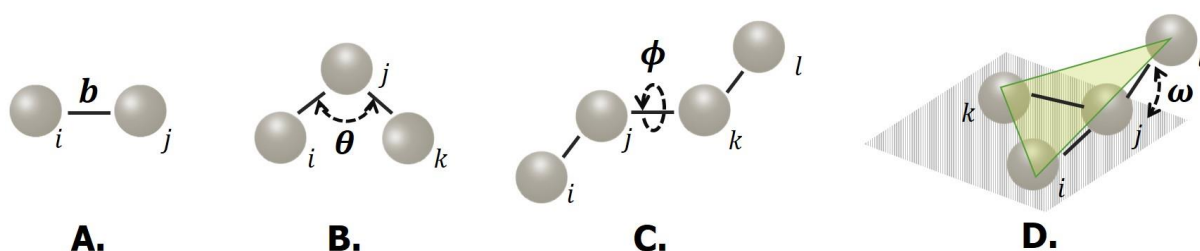


FIGURA 1.8 – Representação esquemática dos diferentes parâmetros considerados na função de energia potencial dos termos ligados nos campos de força. **A.** Comprimento da ligação entre dois átomos –  $b$ . **B.** Ângulo formado por três átomos –  $\theta$ . **C.** Ângulo diédrico ou de torção –  $\phi$ . **D.** Ângulo diédrico impróprio ou ângulo formado pela variação do plano formado por quatro átomos –  $\omega$ .  
Fonte: elaborada pela autora.

Em publicação de 2016, De Vivo e colaboradores sinalizaram que as famílias de campos de força mais usados nas simulações de sistemas biomoleculares são AMBER, CHARMM e OPLS, e que estes campos de força “atingiram um padrão de qualidade tão alto que a preferência por um sobre o outro geralmente é ditada apenas por considerações práticas, relacionadas à sua implementação com o software de trabalho para a execução da DM” (DE VIVO et al., 2016).

A solução numérica da Eq. 2 para o sistema de trabalho gera uma trajetória, a qual é a descrição detalhada da dinâmica do sistema no tempo simulado. Quando o sistema de interesse é uma proteína, as simulações de DM permitem estudar, entre outros, o mecanismo de envelhecimento, propriedades estruturais, mudanças conformacionais, efeitos de mutações e eventos de reconhecimento molecular, como a ligação de fármacos. Durante as mesmas, é possível considerar a presença de solvente e condições como pressão, temperatura e força iônica (MURA; MCANANY, 2014).

De tal modo, a técnica de DM pode ser empregada para o pós-processamento de cálculos de *docking* molecular simulando condições biológicas (DE VIVO et al., 2016; MAKENENI; THIEKER; WOODS, 2018; SAKANO et al., 2016).

### 1.3 – Reconhecimento molecular e interações não-covalentes

O reconhecimento molecular, é dizer, a interação específica entre moléculas que exibem complementaridade química, estérica e eletrostática é a base de todas as funções biológicas e acontece por meio de interações não-covalentes (DU et al., 2016; ERMONDI; CARON, 2006; ISRAELACHVILI, 2011; MURTHY, 2006; RADOUX et al., 2016). Como exemplo de um processo governado pelo reconhecimento molecular tem-se a formação de complexos proteína-ligante. No processo de ligação de uma pequena molécula a uma proteína, acontece a formação e quebra de muitas interações individuais, como a perda de interações não-covalentes da proteína e da pequena molécula com o solvente, a formação de novas interações não-covalentes entre a proteína e a pequena molécula, e a reorganização do solvente em torno ao complexo formado. Durante este processo, cada uma das interações não-covalentes perdidas ou estabelecidas contribui com aproximadamente 1–120 kcal mol<sup>-1</sup> à componente entálpica ( $\Delta H$ ) da energia livre de ligação ( $\Delta G$ )<sup>r</sup>, podendo ter um caráter atrativo (estabilizante) ou repulsivo (desestabilizante) (DU et al., 2016; ERMONDI; CARON, 2006; ISRAELACHVILI, 2011).

As interações não-covalentes de caráter atrativo são interações favoráveis entre regiões com potencial eletrostático positivo e regiões com potencial eletrostático negativo<sup>s</sup> da mesma molécula (intramoleculares) ou de moléculas diferentes (intermoleculares). Tais regiões podem ser induzidas ou fazer parte de um dipolo permanente. Buracos- $\sigma$  ( $\sigma$ -holes, setores de baixa densidade eletrônica aproximadamente lineares ao eixo de uma ligação covalente) e buracos- $\pi$  ( $\pi$ -holes,

---

<sup>r</sup> A energia livre de ligação ( $\Delta G$ ) é o potencial termodinâmico que determina a espontaneidade da formação de um complexo proteína-ligante assim como a estabilidade do mesmo. A energia livre de ligação pode ser escrita em função das mudanças de entalpia ( $\Delta H$ ) e entropia ( $\Delta S$ ) durante o processo de ligação à temperatura  $T$  (em Kelvin) mediante a relação:

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S$$

Onde a entalpia de ligação ( $\Delta H$ ) reflete a mudança de energia do sistema enquanto que a entropia ( $\Delta S$ ) reflete o aumento ou a diminuição geral do grau de liberdade do sistema (DU et al., 2016).

<sup>s</sup> Usualmente, as regiões de potencial positivo e negativo são identificadas com ajuda de mapas do potencial eletrostático. Esses mapas são empregados para identificar, representar e visualizar no espaço tridimensional a distribuição de cargas de uma molécula. A interpretação dos mesmos, baseia-se na escala de cor escolhida para representar as regiões com potencial eletrostático negativo, neutro e positivo e são construídos com base na relação:

$$V_r = \sum_A \frac{Z_A}{|\mathbf{R}_A - \mathbf{r}|} - \int \frac{\rho(\mathbf{r}') d\mathbf{r}'}{|\mathbf{r}' - \mathbf{r}|}$$

Onde  $V_r$ , é o potencial eletrostático – um observável físico – em cada ponto  $\mathbf{r}$ ;  $Z_A$ , é a carga do núcleo  $A$  localizado no ponto  $\mathbf{R}_A$  e  $\rho(\mathbf{r})$ , é a densidade eletrônica da molécula (MURRAY; POLITZER, 2017; POLITZER; MURRAY, 2019).



setores de baixa densidade eletrônica aproximadamente perpendiculares ao eixo de uma ligação covalente) são exemplos de áreas de baixa densidade eletrônica, resultado da distribuição anisotrópica da densidade eletrônica, que usualmente estão associadas a regiões com potencial eletrostático positivo<sup>t</sup> (CLARK; MURRAY; POLITZER, 2018; POLITZER; MURRAY, 2019, 2018). Quando presentes, são as regiões com potencial eletrostático positivo as que determinam a direcionalidade, i.e., os parâmetros geométricos, da interação não-covalente, como observado nas denominadas ligações de hidrogênio (Fig. 1.9), ligações de halogênio (Fig. 1.10) e interações- $\pi$  (Fig. 1.11).

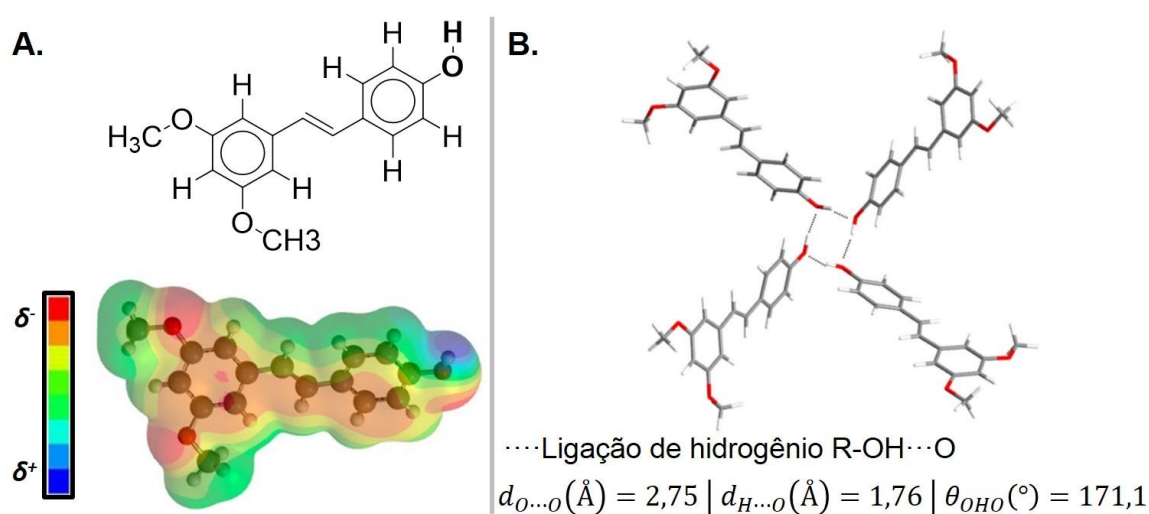


FIGURA 1.9 – Ligações de hidrogênio. **A.** Mapa de potencial eletrostático da molécula de pterostilbene. Pode-se observar que a região de potencial eletrostático mais positivo está associada ao átomo de hidrogênio do grupo fenol. **B.** Ligações de hidrogênio observadas no polimorfo mais estável do pterostilbene. Para cada uma das ligações de hidrogênio, o grupo doador é o  $-\text{OH}_{\text{fenol}}$  de uma molécula enquanto que o grupo aceptor é o átomo  $\text{O}_{\text{fenol}}$  de uma outra molécula. Os átomos  $\text{O}_{\text{fenol}}$ , apresentam um potencial eletrostático negativo por conta dos seus pares isolados de elétrons. Fonte: figuras tomadas e adaptadas com fins acadêmicos de BOFILL et al., 2019.

<sup>t</sup> “Os termos buraco- $\sigma$  e buraco- $\pi$  referem-se as características da densidade eletrônica da molécula em certas regiões. Os potenciais eletrostáticos nessas regiões refletem essas características, mas também refletem as contribuições das distribuições de carga em toda a molécula. Portanto, não há necessariamente uma correspondência direta entre ter um buraco- $\sigma$  ou um buraco- $\pi$  e um potencial positivo” (POLITZER; MURRAY, 2018).

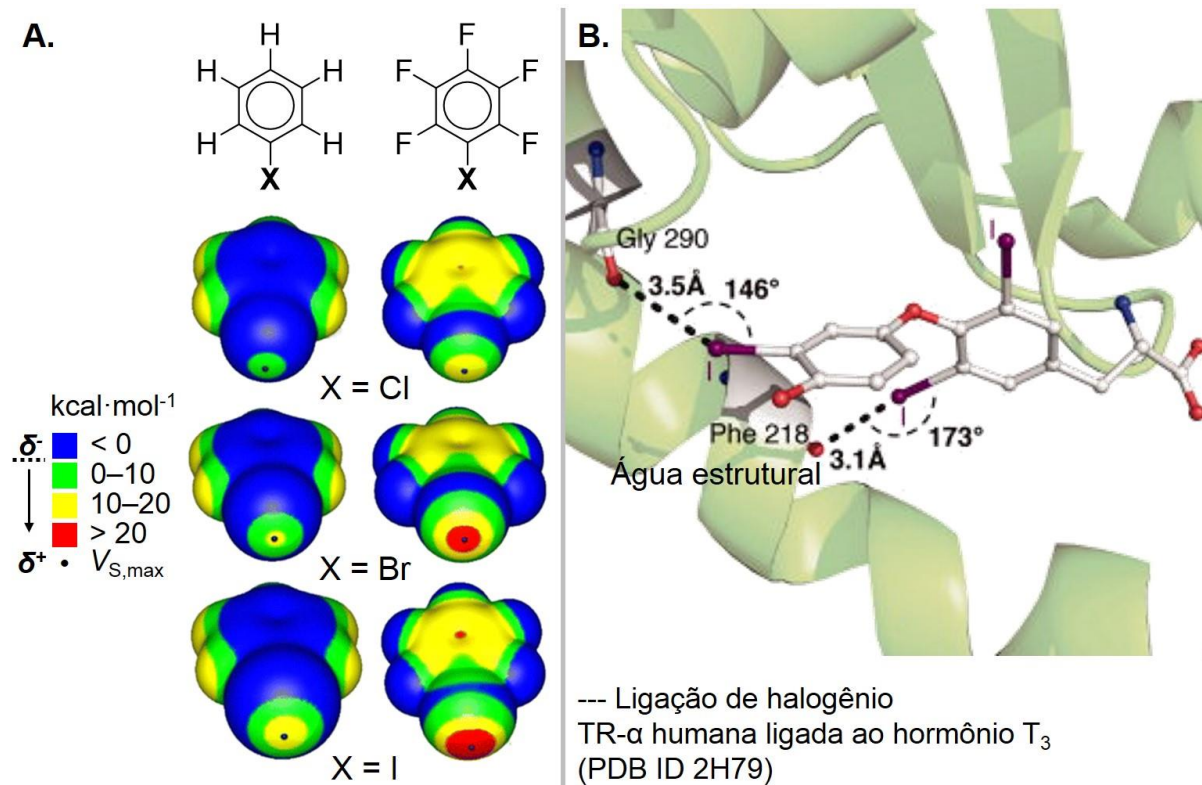


FIGURA 1.10 – Ligações de halogênio. **A.** Mapas de potencial eletrostático para halobenzenos e halopentafluorobenzenos (halogênio X = Cl, Br e I). Podem-se observar regiões de potencial eletrostático positivo associadas aos diferentes buracos- $\sigma$  sobre os átomos de cloro, bromo e iodo e como os valores de  $V_{S,max}$  tornam-se mais positivos quando a polarizabilidade do halogênio X aumenta e/ou pela presença de grupos elétron-atraentes (CAVALLO et al., 2016). **B.** Ligações de halogênio entre os átomos de iodo (em roxo) do hormônio T<sub>3</sub> e o seu aceptor, a proteína TR- $\alpha$ . Os grupos aceptores das ligações de halogênio são i) o átomo de oxigênio da cadeia principal do resíduo Gly290 e ii) o átomo de oxigênio de uma molécula de água estrutural. Aos dois grupos aceptores se encontram associados potenciais eletrostáticos negativos por conta dos seus pares isolados de elétrons.

Fonte: figuras tomadas e adaptadas com fins acadêmicos de CAVALLO et al., 2016 e SCHOLFIELD et al., 2013.

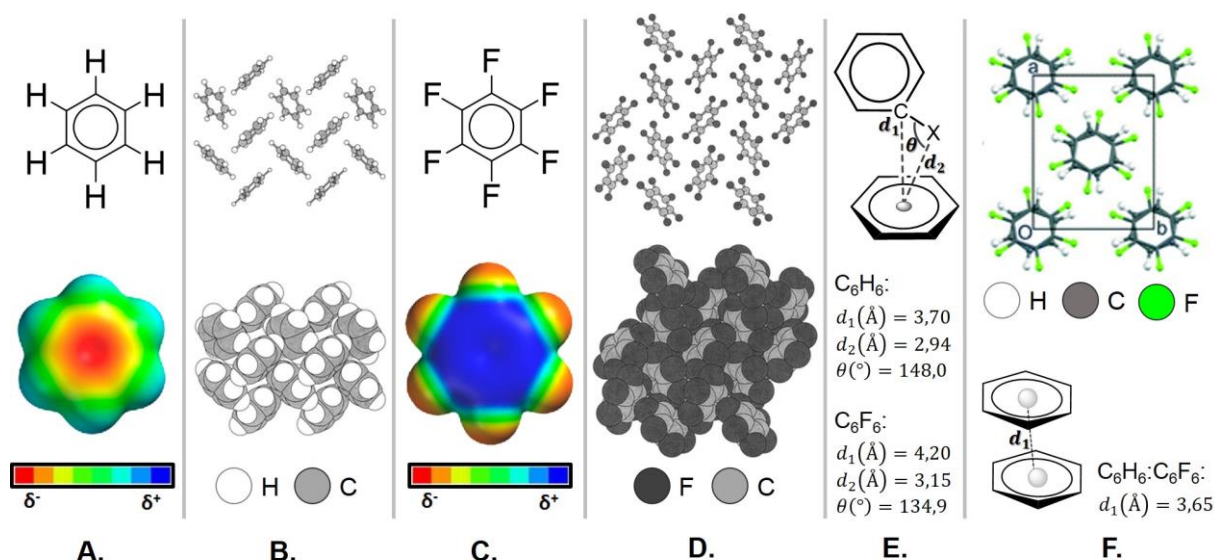


FIGURA 1.11 – Interações- $\pi$ . Mapas de potencial eletrostático e empacotamento cristalino das moléculas de benzeno (A. e B.) e de hexafluorobenzeno (C. e D.) Na molécula de benzeno, podem-se observar regiões de potencial eletrostático positivo sobre os átomos de hidrogênio e uma região de potencial eletrostático negativo perpendicular ao plano do anel (A.). Na molécula de hexafluorobenzeno, pode-se observar uma região de potencial eletrostático positivo associada ao buraco- $\pi$  perpendicular ao plano do anel, consequência dos grupos elétron-atraentes, e diferentes regiões de potencial eletrostático negativo sobre os diferentes átomos de flúor (C.). Estas diferenças na distribuição de cargas, governam o empacotamento cristalino do benzeno (B.), do hexafluorobenzeno (D.) e da mistura 1:1 de benzeno-hexafluorobenzeno (F.). Os empacotamentos cristalinos em B. e D. revelam interações- $\pi$  da forma-T *edge-to-face* entre as moléculas (E.) enquanto que, para a mistura 1:1 benzeno-hexafluorobenzeno são reveladas interações- $\pi$  do tipo empilhamento (F.).

Fonte: figuras tomadas e adaptadas com fins acadêmicos de COCKCROFT et al., 2018; LORENZO; LEWIS; DANCE, 2000 e PACE; GAO, 2013.

Assim, a natureza das interações não-covalentes é coulômbica, envolvendo os efeitos intrínsecos da polarização e eletrostáticos, conforme apontado na mecânica quântica pelo teorema de Hellmann-Feynman<sup>u</sup>. Durante a formação de uma interação não-covalente, a polarização sempre tem um efeito estabilizador atraente enquanto que a eletrostática inclui efeitos estabilizadores (atrações elétron-núcleo) e efeitos desestabilizadores (repulsões núcleo-núcleo e elétron-elétron). Os efeitos atraentes são dominantes até atingir a separação de equilíbrio, i.e., distância na qual a energia potencial de interação atinge o mínimo (Fig. 1.12). Para distâncias menores que a separação de equilíbrio, os efeitos repulsivos prevalecem (CLARK; MURRAY; POLITZER, 2018; POLITZER; MURRAY, 2019). A energia de interação é

<sup>u</sup> Na mecânica quântica, o teorema de Hellmann-Feynman relaciona a derivada da energia total do sistema em relação a um parâmetro, ao valor esperado da derivada do Hamiltoniano em relação a esse mesmo parâmetro. De acordo com o teorema, uma vez que a distribuição espacial dos elétrons é determinada pela resolução da equação de Schrödinger, todas as forças no sistema podem ser calculadas usando a eletrostática clássica (CLARK; MURRAY; POLITZER, 2018).

dependente tanto da distância de separação como das espécies interagindo (Tabela 1.4) (ERMONDI; CARON, 2006; ISRAELACHVILI, 2011).

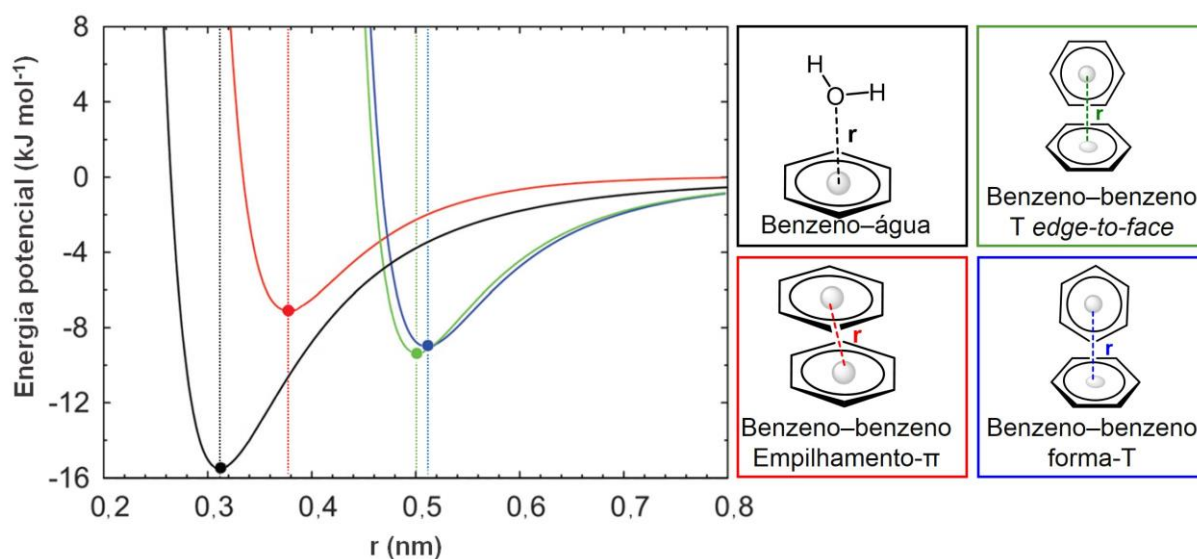


FIGURA 1.12 – Exemplo da dependência energia–distância das interações não-covalentes. Diagramas de energia potencial da interação não-covalente entre o benzeno e uma molécula de água (preto) e de dímeros de benzeno nas geometrias empilhamento- $\pi$  (vermelho), forma-T *edge-to-face* (verde) e forma-T (azul). As separações de equilíbrio de cada interação são ressaltadas com pontos nas diferentes curvas e com linhas pontilhadas no plano. A esquerda das linhas pontilhadas, prevalecem os efeitos repulsivos. A direita, os atrativos.

Fonte: figura tomada e adaptada com fins acadêmicos de FU; TIAN, 2014.

TABELA 1.4 – Tipos de interações não-covalentes de caráter atrativo e sua dependência energia–distância.

Interação não-covalente	Tipos de substâncias interagindo, A e B	Dependência energia–distância
Dipolo induzido–dipolo induzido <sup>†</sup>	A, B: covalente não polar	$1/r^6$
Dipolo–dipolo induzido <sup>†</sup>	A: Polar B: Covalente não polar	$1/r^6$
Dipolo–dipolo <sup>†</sup>	A, B: covalente polar	$1/r^6$
Carga–dipolo induzido	A: iônica ou covalente polar B: covalente não polar	$1/r^4$
Carga–dipolo	A: iônica B: covalente polar	$1/r^2$
Carga–carga <sup>††</sup>	A, B: iônicas de carga oposta	$1/r$
Ligação de hidrogênio	A: átomo de hidrogênio ligado covalentemente a um átomo de maior eletronegatividade B: região nucleofílica <sup>†††</sup> / nucleófilo	$\sim 1/r^2$
Ligação de halogênio	A: átomo de cloro, bromo ou iodo ligado covalentemente B: região nucleofílica <sup>†††</sup> / nucleófilo	n.a.

(continua)

(Continuação)

Interação não-covalente	Tipos de substâncias interagindo, A e B	Dependência energia–distância
Ligação de halogênio	A: átomo de cloro, bromo ou iodo ligado covalentemente B: região nucleofílica <sup>†††</sup> / nucleófilo	n.a.
Interações $\pi$	A: sistema $\pi$ B: sistema $\pi$ , metal, cátion ou ânion	n.a.

<sup>†</sup> As interações dipolo induzido–dipolo induzido (forças de dispersão de London), dipolo–dipolo induzido (forças de Debye) e dipolo–dipolo (forças de Keesom) são comumente conhecidas como interações de van der Waals.

<sup>††</sup> Também conhecidas como pontes salinas.

<sup>†††</sup> Exemplos de regiões nucleofílicas: pares de elétrons isolados e elétrons- $\pi$ .

n.a. = informação não achada.

Fonte: elaborada pela autora com base em ERMONDI; CARON, 2006; ISRAELACHVILI, 2011 e MURTHY, 2006.

Os compostos tipo indol-3-glioxiltirosina aqui estudados apresentam um *scaffold* comum e possuem múltiplas regiões que podem estar envolvidas em diferentes interações não-covalentes. Na Fig. 1.13, essas regiões são assinaladas para o composto **6d** em representação de toda a série.

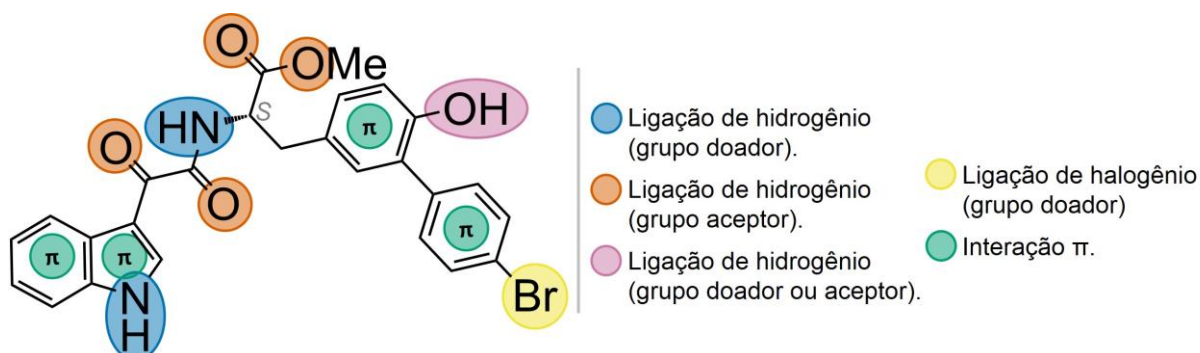


FIGURA 1.13 – Identificação de algumas interações não-covalentes que podem ser estabelecidas pelo composto **6d**.

Fonte: elaborada pela autora.

Empregando a técnica de triagem virtual inversa baseada no *docking* e simulações de dinâmica molecular, o presente trabalho visa identificar potenciais alvos em *Plasmodium falciparum* para os compostos derivados de indol-3-glioxiltirosina com atividade antimalárica *in vitro* reportados por Vasconcelos e colaboradores.

A presente tese desenvolveu-se na Universidade Federal de São Carlos, no Laboratório de Cristalografia, Estereodinâmica e Modelagem Molecular–LaCrEMM do Departamento de Química em conjunto com o Grupo de Física Teórica de Materiais e Biomoléculas–BioMat do Departamento de Física. As linhas de pesquisa nas quais se insere são i) química supramolecular: cocrystalais, interações não covalentes e interações proteínas-ligantes do LaCrEMM e ii) moléculas e biomoléculas: estudos por

métodos experimentais, *docking*, dinâmica molecular e abordagem supramolecular do BioMat. Nos apêndices, são apresentadas as publicações em jornais científicos resultado de trabalhos paralelos desenvolvidos.

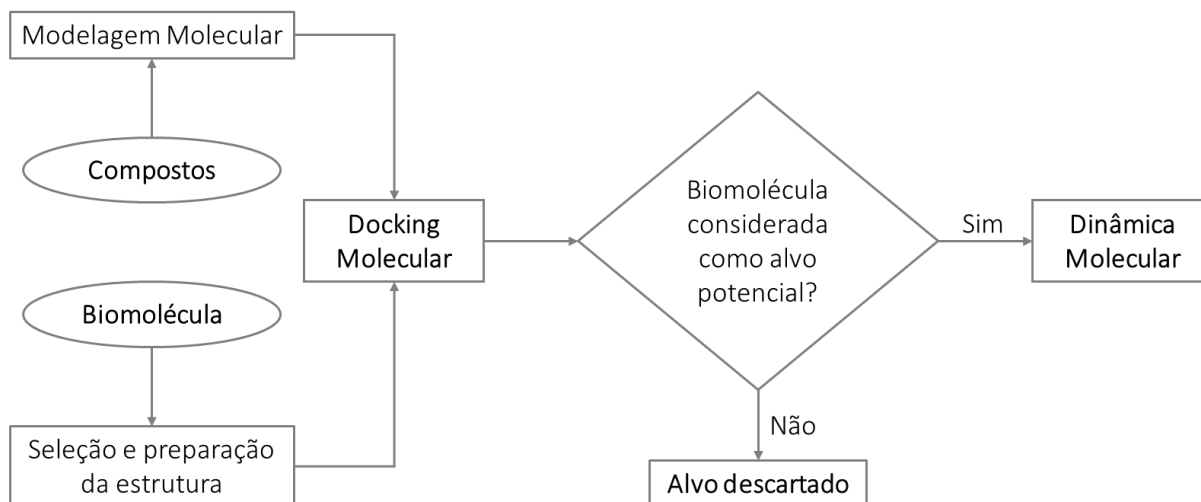
## CAPÍTULO 2 – OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho foi o de identificar, empregando a técnica de triagem virtual inversa baseada no *docking*, potenciais alvos em *Plasmodium falciparum* para os derivados de indol-3-glioxiltirosina com atividade antimalárica *in vitro* reportados por Vasconcelos e colaboradores. Os objetivos específicos foram:

- Modelar as estruturas tridimensionais dos derivados indol-3-glioxiltirosina com atividade antimalárica *in vitro* reportados por Vasconcelos e colaboradores.
- Efetuar simulações de *docking* molecular em estruturas de proteínas de *Plasmodium falciparum* disponíveis no Banco de Dados de Proteínas e consideradas como alvos possíveis.
- Determinar um subconjunto de alvos potenciais após análises em tela gráfica dos diferentes resultados de *docking*.
- Estudar a estabilidade dos complexos obtidos por *docking* nos alvos considerados como promissores empregando simulações de dinâmica molecular.

## CAPÍTULO 3 – MATERIAIS E MÉTODOS

As etapas gerais seguidas no desenvolvimento do presente trabalho são as apresentadas no Esquema 3.1:



ESQUEMA 3.1 – Etapas gerais envolvidas no desenvolvimento do presente trabalho.  
Fonte: elaborada pela autora.

### 3.1 – Modelagem molecular dos compostos

Dada a ausência de estruturas cristalográficas, a modelagem molecular dos derivados da indol-3-glioxiltirosina (Tabela 3.1), sintetizados, caracterizados e reportados previamente por VASCONCELOS et al. (2019), foi realizada no programa Discovery Studio Visualizer v.17.2.0.16349 (BIOVIA, 2016). O confórmero tridimensional da *N*-(1*H*-indol-3-iloacetil)-*DL*-tirosina disponível na base de dados PubChem (PubChem CID: 355071 (KIM et al., 2019)) foi utilizado como modelo. Obtiveram-se estruturas numa conformação intermédia entre a linear e a U (Fig. 3.1). Não foram atribuídas cargas. Todos os átomos de hidrogênio foram adicionados.

TABELA 3.1 – Códigos de identificação e nomes IUPAC dos derivados da indol-3-glioxiltirosina.

Código	Nome
6a	Metil (S)-2-(2-(1 <i>H</i> -indol-3-il)-2-oxoacetamido)-3-(6-hidroxi-[1,1'-bifenil]-3-il)propionato
6b	Metil (S)-2-(2-(1 <i>H</i> -indol-3-il)-2-oxoacetamido)-3-(4'-fluoro-6-hidroxi-[1,1'-bifenil]-3-il)propionato
6c	Metil (S)-2-(2-(1 <i>H</i> -indol-3-il)-2-oxoacetamido)-3-(4'-cloro-6-hidroxi-[1,1'-bifenil]-3-il)propionato

(continua)



(Continuação)

Código	Nome
6d	Metil (S)-2-(2-(1 <i>H</i> -indol-3-il)-2-oxoacetamido)-3-(4'-bromo-6-hidroxi-[1,1'-bifenil]-3-il)propionato
6e	Metil (S)-2-(2-(1 <i>H</i> -indol-3-il)-2-oxoacetamido)-3-(4-hidroxi-3-(5-metiltiofen-2-il)fenil)propionato
6f	Metil (S)-2-(2-(1 <i>H</i> -indol-3-il)-2-oxoacetamido)-3-(4-hidroxi-3-(tiofen-3-il)fenil)propionato
6h	Metil (S)-2-(2-(1 <i>H</i> -indol-3-il)-2-oxoacetamido)-3-(4'-( <i>tert</i> -butil)-6-hidroxi-[1,1'-bifenil]-3-il)propionato
6i	Metil (S)-2-(2-(1 <i>H</i> -indol-3-il)-2-oxoacetamido)-3-(3',6-dihidroxi-[1,1'-bifenil]-3-il)propionato
6j	Metil (S)-2-(2-(1 <i>H</i> -indol-3-il)-2-oxoacetamido)-3-(4-hidroxi-3-(naftalen-2-il)fenil)propionato
6k	Metil (S)-2-(2-(1 <i>H</i> -indol-3-il)-2-oxoacetamido)-3-(4'-acetil-6-hidroxi-[1,1'-bifenil]-3-il)propionato
6l	Metil (S)-2-(2-(1 <i>H</i> -indol-3-il)-2-oxoacetamido)-3-(6-hidroxi-4'-(trifluorometil)-[1,1'-bifenil]-3-il)propionato

Fonte: elaborada pela autora com base em VASCONCELOS et al., 2019.

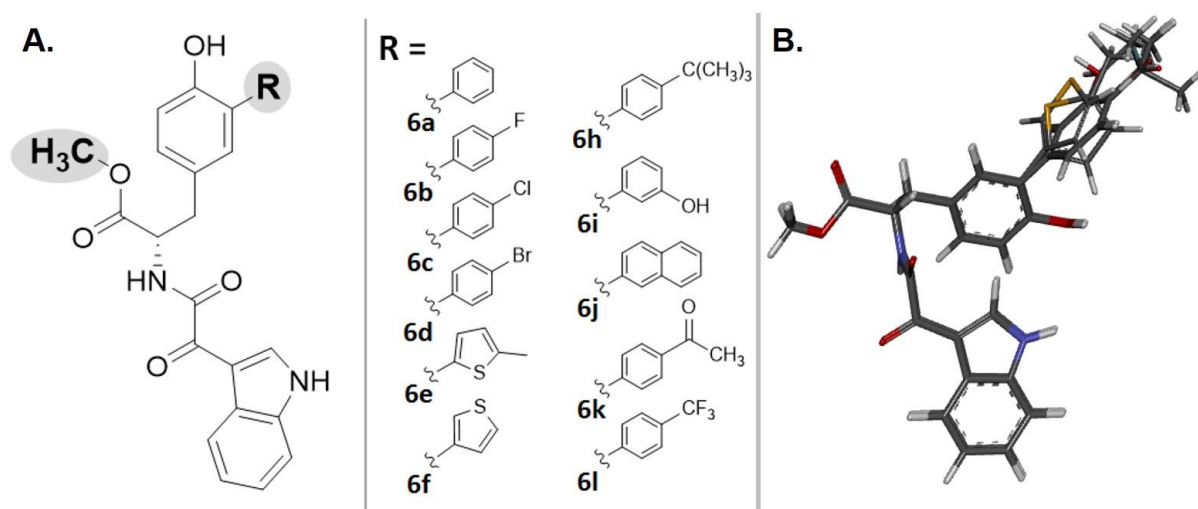


FIGURA 3.1 – Modelagem molecular dos compostos. **A.** Representação bidimensional da estrutura da (2-(1*H*-indol-3-il)-2-oxoacetil)-*L*-tirosina empregada como modelo para a modelagem dos diferentes derivados da indol-3-glioxiltirosina. Os grupos modelados são destacados com sombra cinza. **B.** Superposição das estruturas modeladas.

Fonte: elaborada pela autora.

### 3.2 – Busca, seleção e preparação das biomoléculas

As estruturas tridimensionais das diferentes biomoléculas de *Plasmodium falciparum* aqui avaliadas foram obtidas do Banco de Dados de Proteínas (PDB, do inglês *Protein Data Bank*) (BERMAN et al., 2000). Trabalhou-se com estruturas determinadas por difração de raio-X contendo pelo menos um ligante cristalográfico do tipo inibidor, garantindo assim que as mesmas estão numa conformação adequada para a formação de complexos. Em 28 de maio de 2019, o

total de estruturas de *P. falciparum* cumprindo os critérios acima descritos ascendia a 230, representando um total de 40 tipos de enzimas diferentes.

No desenvolvimento do trabalho, foram priorizados alvos enzimáticos essenciais para o parasito no seu estágio intra-eritrocítico, estágio no qual foram efetuados os ensaios *in vitro* reportados (VASCONCELOS et al., 2019).

No caso de enzimas com mais de uma estrutura disponível, foram preferidas aquelas com as melhores resoluções e as sequências mais completas, quer dizer, contendo a menor quantidade de *gaps* quando alinhadas. Exceto quando indicado em contrário, todas as moléculas de água e de co-cristalizantes (e.g. moléculas de etilenoglicol e íons sulfato) foram removidas. Nos casos em que um mesmo resíduo/inibidor apresentasse mais de uma conformação, foi escolhida aquela com o maior valor de ocupação. Quando possível, trabalhou-se com uma única cadeia.

### 3.3 – *Docking* molecular

As simulações de *docking* molecular foram executadas utilizando o programa GOLD v.5.6.1 (JONES et al., 1997; JONES; WILLETT; GLEN, 1995) disponível dentro da CSD-Discovery Suite, disponibilizada pela CAPES via Dot.Lib Brasil. As estruturas de partida foram as estruturas das biomoléculas (receptores, seção 1.3.2) e as moléculas modeladas (ligantes, seção 1.3.1). Trabalhou-se sob a aproximação de receptor rígido–ligante flexível. Como configurações gerais foram estabelecidas:

- Preparação da estrutura da proteína: a adição dos átomos de hidrogênio foi realizada de forma automática no GOLD. Caso não seja indicado, trabalhou-se com os estados de protonação e tautômeros predefinidos pelo programa.
- Definição do sítio de ligação: o sítio de ligação foi definido como todos os átomos da proteína presentes em uma distância de até 6,0 Å (exceto quando indicado em contrário) ao redor do ligante (inibidor) cristalográfico. Detectou-se a cavidade e todos os átomos doadores/aceptores de ligações de hidrogênio foram tratados como acessíveis pelo solvente.
- Seleção da função *fitness*: Foi selecionada a função de pontuação ChemPLP. Não foi permitida a terminação antecipada (*early termination*).

- Configurações do Algoritmo Genético: Trabalhou-se com a opção automática—muito flexível.

As avaliações em tela gráfica dos resultados obtidos (pelo menos 10 poses por ligante) foram realizadas empregando o programa Discovery Studio Visualizer v.17.2.0.16349.

Os parâmetros de análises para determinar a viabilidade de um receptor ser ou não um alvo provável dos compostos além dos valores de pontuação obtidos foram i) o reconhecimento de um padrão de ligação preferencial por parte dos compostos (i.e., cluster de poses majoritário. A pose de maior pontuação do cluster foi a escolhida para análises em cada caso) e ii) a identificação da reprodução de interações intermoleculares consideradas como fundamentais para a inibição do alvo.

### **3.4 – Identificação de interações não-covalentes**

Na identificação de interações não-covalentes foram tomados os seguintes valores como referência:

- Interações de van der Waals: se empregaram os valores dos raios de van der Waals para elementos não metálicos apresentados por Bondi (BONDI, 1964).
- Interações- $\pi$ : Para a determinação de interações de empilhamento  $\pi$ - $\pi$  do tipo face a face, paralelo deslocado e de forma-T, levaram-se em consideração os parâmetros de distância apresentados para o dímero de benzeno por Sinnokrot & Sherrill (SINNOKROT; SHERRILL, 2004, 2006).
- Ligações de hidrogênio: se empregaram como parâmetros os considerados pela função de pontuação ChemPLP (KORB; STÜTZLE; EXNER, 2009).
- Ligações de halogênio: se empregaram como parâmetros os considerados por Ho (HO, 2014).

### **3.5 – Representação espacial de interações não-covalentes**

Para a representação gráfica das regiões de interações não-covalentes, empregou-se o programa NCIPLLOT v.3.0. (CONTRERAS-GARCÍA et al., 2011; JOHNSON et al., 2010), auxiliando-se na construção dos gráficos bidimensionais com o pacote gnuplot v.5.2 e na representação das interações no espaço real com o

programa PyMOL v.1.8 (DELANO, 2014). Trabalhou-se com a aproximação de densidades promoleculares empregando o gradiente de cores arco-íris (violeta-índigo-azul-verde-amarelo-laranja-vermelho). As faixas de trabalho do Gradiente de Densidade Reduzida (RDG, das siglas em inglês) e da densidade ( $\rho$ ) são indicadas em cada caso.

### 3.6 – Dinâmica molecular

As simulações de dinâmica molecular foram realizadas utilizando os complexos resultantes das simulações de *docking* considerados como promissores.

As simulações de DM foram realizadas usando GROMACS versão 5.1.4 (ABRAHAM et al., 2015; BERENDSEN; VAN DER SPOEL; VAN DRUNEN, 1995; VAN DER SPOEL et al., 2005). Ligações nos complexos envolvendo átomos de hidrogênio foram restringidas com o algoritmo LINCS (HESS et al., 1997). As moléculas de água foram tratadas com o algoritmo SETTLE (MIYAMOTO; KOLLMAN, 1992). O campo de força aditivo *all-atom* CHARMM36 (BEST et al., 2012; HUANG et al., 2017) foi usado para tratar os complexos proteína-ligante. A topologia e parametrização dos ligantes foi gerada no servidor SwissParam (ZOETE et al., 2011).

Os complexos foram inseridos em caixas cúbicas, com pelo menos 1,3 nm de comprimento desde o mesmo até a fronteira da caixa, e solvatados com moléculas pré-equilibradas de água TIP3P (JORGENSEN et al., 1983). Nas caixas de água foram adicionados, em posições aleatórias, íons sódio e cloreto suficientes para atingir tanto a neutralidade como uma concentração 0,15 mol·L<sup>-1</sup>. Após montagem dos sistemas realizou-se a minimização dos mesmos usando o algoritmo *steepest descent* (50000 passos com um tamanho de passo de 0,01 kJ·mol<sup>-1</sup>), definindo uma restrição de posição para os átomos não-hidrogênios dos ligantes. Em seguida, foram realizadas equilibrações usando os ensambles NVT (2 ns) e NpT (3 ns) fixando os átomos não-hidrogênios tanto da proteína como dos ligantes. Por último, para cada sistema considerado, foram executadas três simulações de dinâmica molecular independentes (para o qual foi mudado o número correspondente à semente para o gerador de números aleatórios) de 100 ns cada, com intervalos de tempo de 2 fs, liberando todas as restrições de posição.

Os sistemas foram simulados usando condições periódicas de fronteira e mantendo uma temperatura constante de 310 K (controlada por um termostato

modificado Berendsen) e uma pressão de 1 bar (controlada por um barostato de Berendsen (BERENDSEN et al., 1984) durante as equilibrações e por um barostato Parrinello-Rahman (PARRINELLO; RAHMAN, 1981) durante a fase de produção). As interações não-ligadas foram truncadas em 1,2 nm. O método de Partícula-Malha Ewald (PME, do inglês *Particle-Mesh Ewald* (DARDEN; YORK; PEDERSEN, 1993)) foi utilizado para o tratamento das interações eletrostáticas de longo alcance, definindo um espaçamento da grelha de 0,16 nm e uma ordem de interpolação de 4.

As análises das diferentes trajetórias, considerando os 10001 *snapshots* gerados em cada caso, foram realizadas com os programas disponíveis no pacote GROMACS, empregando as configurações padrão caso não seja indicado o contrário. Para a atribuição da estrutura secundária, foi usado GROMACS em conjunto com o programa DSSP (KABSCH; SANDER, 1983). As avaliações em tela gráfica dos resultados obtidos e geração de gráficos 3D, foram realizadas empregando os programas VMD v.1.9.2 (HUMPHREY; DALKE; SCHULTEN, 1996) e PyMOL v.1.8 (DELANO, 2014). Os diferentes gráficos 2D foram gerados empregando o pacote gnuplot v. 5.2.

## CAPÍTULO 4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

No total, 230 estruturas de *Plasmodium falciparum* depositadas no PDB satisfizeram os critérios de busca definidos. Estas estruturas representam 40 enzimas diferentes, como apresentado na Tabela 4.1. Como conjunto base para a execução da triagem virtual inversa baseada no *docking*, tomaram-se as 34/40 estruturas que foram verificadas, mediante revisão bibliográfica, como presentes e/ou essenciais durante o estágio intra-eritrocítico da infecção. Em seguida, serão apresentados os resultados obtidos nas enzimas dihidroorotato desidrogenase (DHODH) e plasmepsina II (PMII), as quais foram consideradas como alvos viáveis no *Plasmodium falciparum* para os derivados da indol-3-glioxiltirosina.

TABELA 4.1 – Sumário das estruturas de *P. falciparum* que satisfizeram os critérios de busca definidos no PDB. Para cada enzima, indica-se se a mesma é expressada e/ou é um alvo essencial, i.e., indispensável para o parasito, durante o estágio intra-eritrocítico da infecção.

Classificação	n. E.C.	Abreviatura <sup>†</sup>	n. de Estruturas <sup>††</sup>	Expressada e/ou essencial no estágio intra-eritrocítico?
Oxidoreductases	1.1.1.27	LDH	5	Sim
	1.1.1.267	DXR	19	Sim
	1.2.1.12	GAPDH	2	Sim
	1.3.1.9	ENR	24	Não
	1.3.5.2	DHODH	17	Sim
	1.5.1.3/2.1.1.45	DHFR-TS	13	Sim
	1.6.5.3	NDH2	1	Não
	1.20.4.1 (1.8.4.2)	Grx1	3	Sim
Transferases	2.3.1.2	ATC	1	Sim
	2.3.1.48	GCN5	1	Sim
	2.4.2.1	PNP	8	Sim
	2.4.2.22/2.4.2.8	HGXPRT	2	Sim
	2.5.1.16	SpdS	4	Sim
	2.7.4.9	TMPK	3	Sim
	2.7.11.1	CDPK2	1	Não
	2.7.11.1	CDPK4	1	Não
	2.7.11.11	PKAR	1	Sim
	2.7.11.22/2.7.11.23	PK5	2	Sim
Hidrolases	3.1.1.96	DTD	3	Sim
	3.4.11.-	PfA-M1	44	Sim
	3.4.11.1	PfA-M17	8	Sim
	3.4.22.-	Falcpain-2	1	Sim
	3.4.22.-	Falcpain-3	1	Sim
	3.4.23.38	PMI	1	Sim
	3.4.23.39	PMII	19	Sim
	3.4.23.-	PMIV	1	Sim
	3.4.23.-	HAP	3	Sim
	3.5.1.88	PDF	1	Sim
	3.5.3.1	Arginase	3	Não
	3.5.4.4	ADA	1	Sim
3.6.1.23	dUTPase	6	Sim	

(Continua)

(Continuação)

Classificação	n. E.C.	Abreviatura <sup>†</sup>	n. de Estruturas <sup>††</sup>	Presente e/ou essencial no estágio intra-eritrocítico?
Liasas	4.1.1.23	OMPD	6	Sim
	4.1.2.13	TRAP	1	Não
	4.2.1.-	FabZ	2	Sim
	4.2.3.12	PTPS	1	Sim
Isomerases	5.2.1.8	FKBP35	4	Sim
	6.1.1.1	TyrRS <sup>‡</sup>	1	Sim
Ligases	6.1.1.2	TrpRS <sup>‡</sup>	1	Sim
	6.1.1.6	Lysyl-tRNA	9	Sim
	6.1.1.15	ProRS	5	Sim

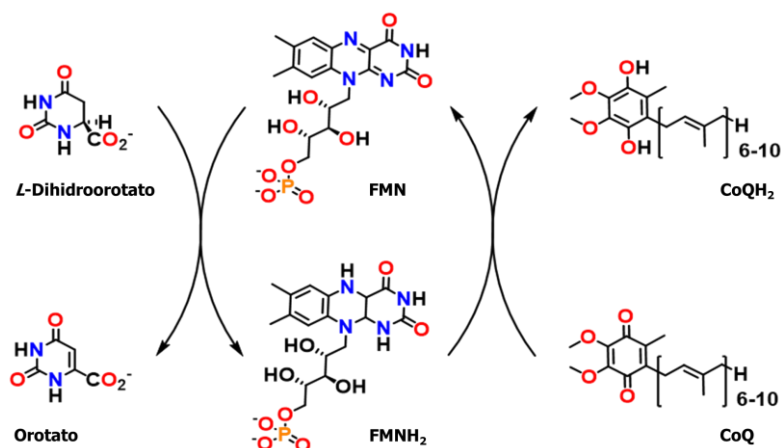
<sup>†</sup> Abreviaturas fornecidas dos nomes em inglês. <sup>††</sup> Último levantamento: 28 de maio de 2019.

<sup>‡</sup> Estruturas consideradas por conter os substratos *L*-tirosina (TyrRS) e *L*-triptofano (TrpRS).

Fonte: elaborada pela autora com base em dados coletados do Banco de Dados de Proteínas (BERMAN, 2000) e de BANSAL et al., 2017; BHATT et al., 2010; BRACCHI-RICARD et al., 2001; CASSERA et al., 2011; CUI et al., 2007; DITTRICH et al., 2008; DOWLING et al., 2010; JAIN et al., 2017; KE et al., 2019; LUNEV et al., 2016; MORAHAN; WANG; COPPEL, 2009; PASAJE et al., 2016; RAJAN et al., 2013; RAMYA; SUROLIA; SUROLIA, 2006; VAN SCHAIJK et al., 2014; VIDADALA et al., 2014; WHITTINGHAM et al., 2010 e WURTZ et al., 2009 em conjunto com o sítio web *Malaria Parasite Metabolic Pathways* (GINSBURG; ABDEL-HALEEM, 2016).

#### 4.1 – Avaliação da enzima dihidroorotato desidrogenase de *P. falciparum*

A enzima dihidroorotato desidrogenase de *P. falciparum* (DHODH, E.C. 1.3.5.2) catalisa a única reação redox na via exclusiva para obtenção de pirimidinas no parasito: a oxidação do *L*-dihidroorotato para orotato (ORO) na presença do cofator mononucleótido de flavina (FMN) e da coenzima ubiquinona (CoQ) (Esquema 4.1). Esta enzima monomérica, essencial para o parasito, localiza-se na membrana interna mitocondrial (pH ~ 7,0–7,4), sendo classificada como uma DHODH do tipo 2 (KRUNGKRAI, 1995; SINGH et al., 2017).



ESQUEMA 4.1 – Reação catalisada pela enzima DHODH *Pf* na presença do cofator FMN e da coenzima CoQ.

Fonte: elaborada pela autora com base em SINGH et al., 2017.

Dezessete estruturas da DHODHPf ligadas a um inibidor, o produto da reação enzimática ORO e o cofator FMN encontraram-se depositadas no PDB (Tabela 4.2). Em todas, o inibidor cristalográfico ocupa o sítio de ligação da coenzima CoQ, sítio que será daqui em diante referido como “*sítio dos inibidores*”.

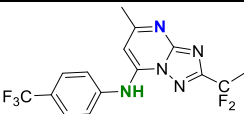
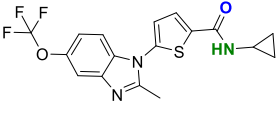
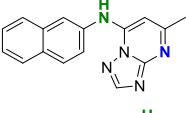
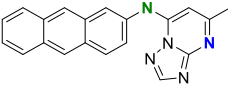
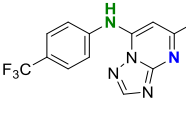
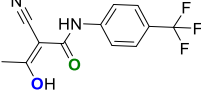
TABELA 4.2 – Códigos de identificação (PDB IDs) e resolução das estruturas da DHODHPf consideradas. Para cada PDB ID, é apresentado o respectivo inibidor cristalográfico junto com os valores *in vitro* de IC<sub>50</sub> na enzima e de EC<sub>50</sub> na linhagem 3D7 de Pf.

Estrutura†		Inibidor		Estrutura 2D††	DHODHPf IC <sub>50</sub> (µM)	3D7 EC <sub>50</sub> (µM)	Ref.
PDB ID	Res. (Å)	ID PDB/Ref.					
6E0B‡	2,099	JZ8/ DSM1		--	--	WHITE et al., 2019	
6GJG	1,99	FIT/ 15		0,068	0,081	KOKKONDA et al., 2018	
5TBO	2,15	78Z/ DSM421		0,053	0,014	PHILLIPS et al., 2016	
5FI8	2,32	5Y5/ 13		0,0046	0,00039	KOKKONDA et al., 2016	
5DEL	2,20	D59/ DSM59		0,016	--	DENG et al., 2015	
4RX0	2,25	D65/ DSM265		0,024	0,0046	PHILLIPS et al., 2015	
5BOO	2,80						
4ORM	2,07	2V6/ DSM338		0,022	0,0018	DENG et al., 2014	
4CQ8	1,98	JBW/ Genz- 669178		0,08	13		
4CQ9	2,72	XBL/ IDI-6253		3,5	12000	ROSS et al., 2014	
4CQA	2,82	ID6/ IDI-6273		13,5	2300		

(Continua)



(Continuação)

Estrutura†		Inibidor		Estrutura††	DHODHPf IC <sub>50</sub> (μM)	3D7 EC <sub>50</sub> (μM)	Ref.
PDB ID	Res. (Å)	ID PDB/Ref.					
3SFK	2,95	D67/ DSM267			0,038	0,010	COTERON et al., 2011
3O8A	2,30	O8A/ Genz- 667348			0,022	0,007	BOOKER et al., 2010
3I65	2,00	JZ8/ DSM1			0,047	--	
3I68	2,40	J4Z/ DSM2			0,056	--	DENG et al., 2009
3I6R	2,50	J5Z/ DSM74			0,28	--	
1TV5	2,40	A26/ A77 1729			--	--	HURT; WIDOM; CLARDY, 2006

† Além do inibidor, as estruturas apresentam os ligantes ORO e FMN (produto da reação enzimática e cofator, respectivamente). †† Ressaltam-se os grupos que interagem mediante ligações de hidrogênio com as cadeias laterais dos resíduos His185 (verde) e Arg265 (azul). ‡Mutante C276F. Fonte: elaborada pela autora com base nas referências apresentadas na última coluna da tabela.

O sítio dos inibidores na DHODHPf localiza-se junto ao bolso de ligação do cofator FMN, baixo as hélices  $\alpha 2$  e  $\alpha 11$  e acima do domínio  $\beta/\alpha$ -barril (Fig. 4.1) (DENG et al., 2014). Dentre os resíduos que conformam o sítio dos inibidores temos a His185, Phe227, Cys233, e a Arg265. Após alinhamento e comparação das 17 estruturas, identificou-se que aquelas com PDB ID 1TV5, 3O8A, 4CQ9, 4CQA, 4ORM e 5DEL conseguem representar as diferentes configurações observadas para o sítio de ligação dos inibidores, em função do posicionamento das cadeias laterais dos resíduos Phe171, His185, Phe188 e Arg265. Este subconjunto pode, ao mesmo tempo, ser subdividido em dois, baseando-se na posição relativa da cadeia lateral do resíduo Phe188. Nas estruturas com PDB ID 1TV5, 3O8A e 4CQA, a cadeia lateral da Phe188 encontra-se “para baixo”. Em contraste, nas estruturas com PDB ID 4CQ9, 4ORM e 5DEL, a cadeia lateral da Phe188 encontra-se “para acima”, aumentando a profundidade desta cavidade (Fig. 4.2).

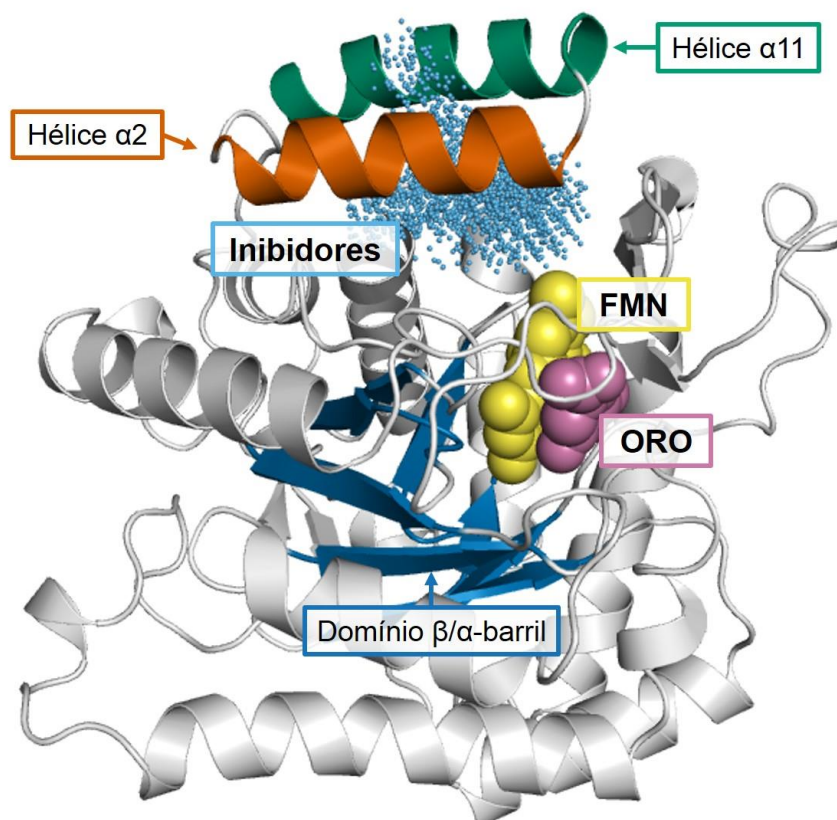


FIGURA 4.1 – Estrutura tridimensional da DHODHPf. O produto da reação enzimática (ORO, magenta) e a coenzima (FMN, amarelo) são apresentados no modelo de preenchimento do espaço. A região dos inibidores cristalográficos está representada como pontos (azul claro). São indicadas as posições das hélices  $\alpha 2$  (laranja) e  $\alpha 11$  (verde) e do domínio  $\beta/\alpha$ -barril (azul escuro).  
Fonte: elaborada pela autora com base em DENG et al., 2014.

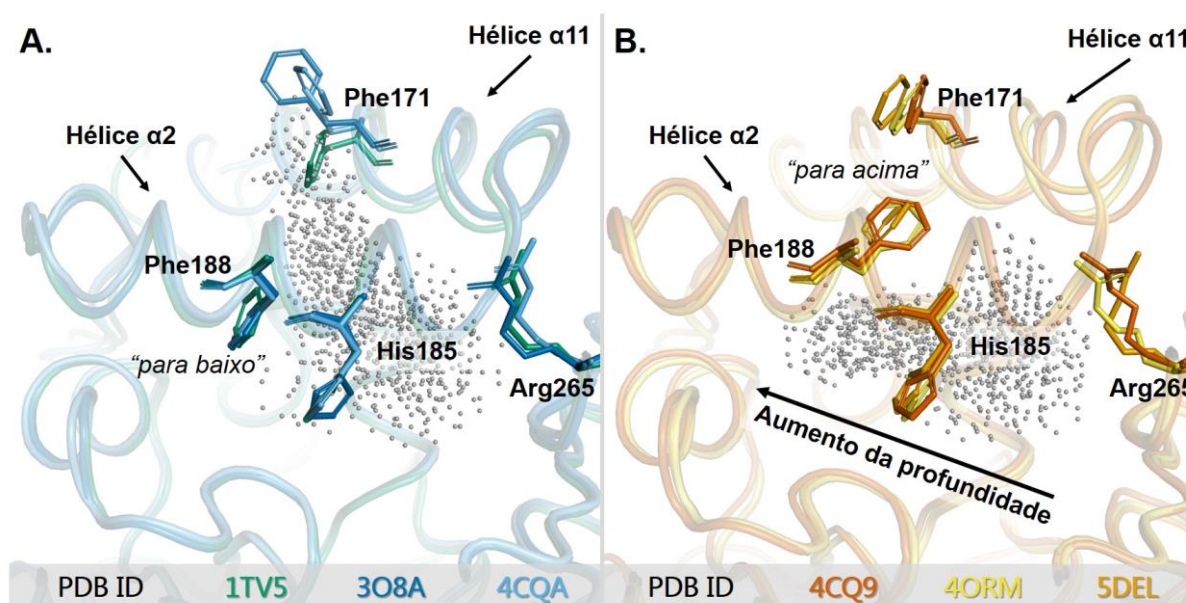
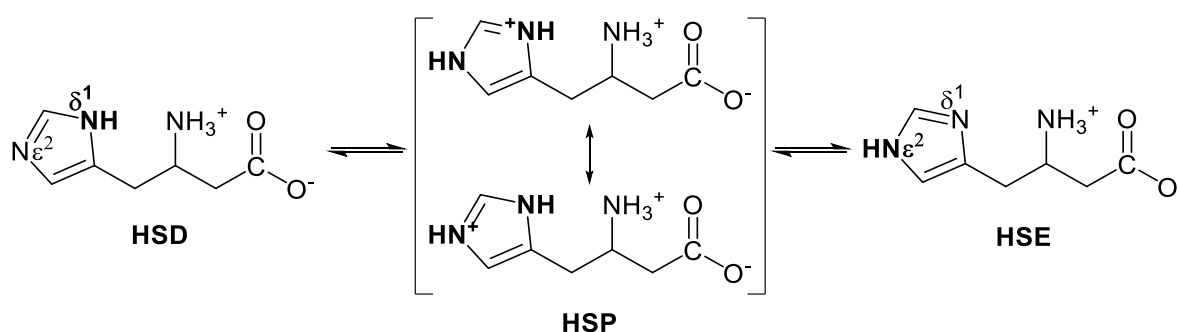


FIGURA 4.2 – Sítio de ligação dos inibidores na DHODHPf. Comparação das posições dos resíduos Phe171, His185, Phe188 e Arg265 nas estruturas com PDB ID 1TV5, 3O8A, 4CQA (A.) e com PDB ID 4CQ9, 4ORM e 5DEL (B.). Pode-se observar que, quando a cadeia lateral do resíduo Phe188 está “para cima”, a profundidade do sítio de ligação dos inibidores (representado com pontos cinzas), aumenta.

Fonte: elaborada pela autora.

A determinação do estado de protonação do resíduo His185 a ser considerado nas simulações, realizou-se mediante avaliação das interações tipo ligação de hidrogênio (HB, do inglês *hydrogen bond*) que o mesmo estivesse efetuando com outros resíduos e/ou com os inibidores nas diferentes estruturas. Esta avaliação mostrou que o resíduo His185 pode adotar os estados de protonação denominados como HSE e HSP (Esquema 4.2). Nas estruturas com PDB IDs 4CQ9 e 4CQA, as quais contém os inibidores com a menor potência, observou-se que a cadeia lateral da His185 não estabelece HBs com outros resíduos nem com o inibidor (Tabela 4.2), enquanto nas 15 estruturas restantes, observou-se que a cadeia lateral da His185 poderia estar realizando, simultaneamente, duas ligações de hidrogênio. O primeiro HB seria entre o átomo de oxigênio da cadeia principal do resíduo Phe227 e o átomo  $N\epsilon^2$  da cadeia lateral do resíduo His185 (Phe227:O–His185: $N\epsilon^2$ ), indicando que o átomo His185: $N\epsilon^2$  deve estar protonado. O segundo HB é entre os inibidores e o átomo  $N\delta^1$  da cadeia lateral do resíduo His185 (His185: $N\delta^1$ ). Neste último caso, a protonação do átomo His185: $N\delta^1$  depende de se o inibidor atua como grupo aceptor do HB (e.g., na estrutura com PDB ID 1TV5, Fig. 4.3, A e C.) ou como grupo doador do HB (e.g., na estrutura com PDB ID 4ORM, Fig. 4.3, B. e D.).



ESQUEMA 4.2 – Possíveis estados de protonação do aminoácido *L*- $\alpha$ -histidina a valores de pH próximos ao fisiológico. Nomenclatura tomada do campo de força CHARMM36.  
Fonte: Elaborada pela autora com base em LI; HONG, 2011.

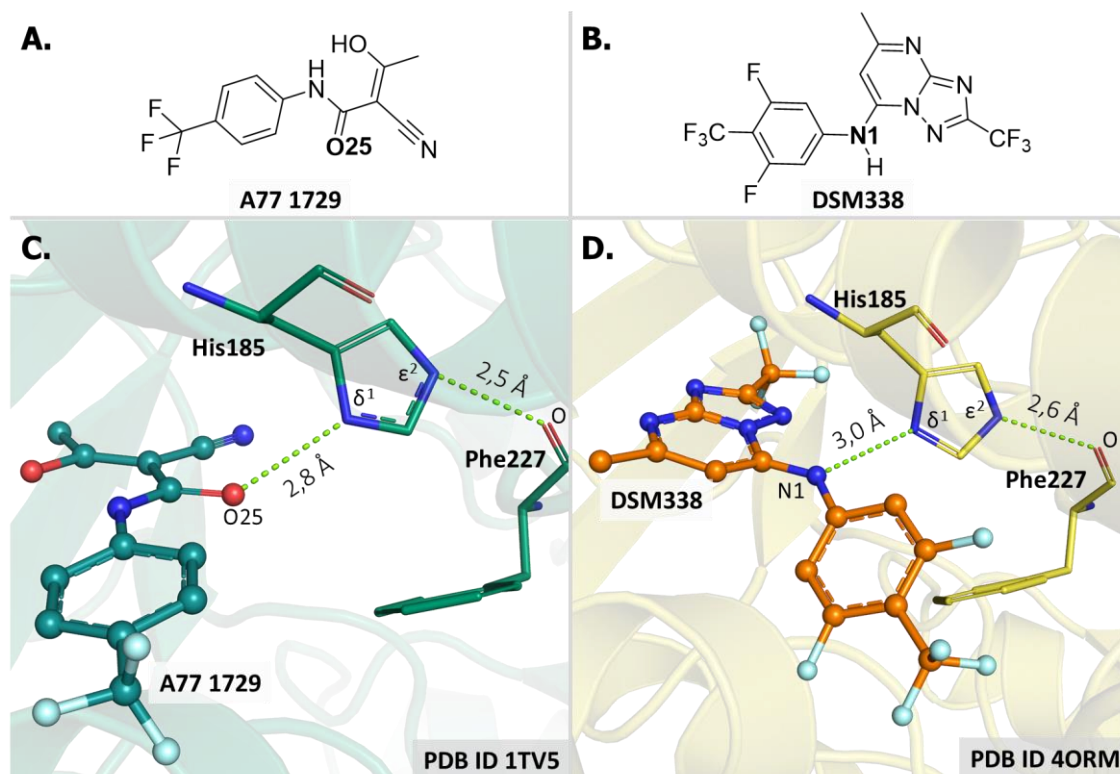


FIGURA 4.3 – Ligações de hidrogênio da cadeia lateral da His185 nas estruturas cristalográficas da DHODHPf. Representação bidimensional dos inibidores A77 1729 (A.) e DSM338 (B.) e ligações de hidrogênio (representadas por linhas ponteadas) estabelecidas pelo resíduo His185 nas estruturas da DHODHPf com PDB ID 1TV5 (C.) e 4ORM (D.).

Fonte: elaborada pela autora.

Com fins ilustrativos, apresentam-se as superfícies correspondentes às interações não-covalentes entre os grupos His185-HSP, Phe227 e inibidor A77 1729 da estrutura com PDB ID 1TV5 e His185-HSE, Phe227 e inibidor DSM338 da estrutura com PDB ID 4ORM (Fig. 4.4). Os diferentes HBs estabelecidos com a His185 são revelados como superfícies bem definidas no espaço, em torno a valores de densidade ( $\rho$ ) compreendidos entre 0,04–0,07 u.a., com caráter meramente atraente (ao ser o sinal do  $\lambda_2$  negativo), o que se reflete nos tons azulados.

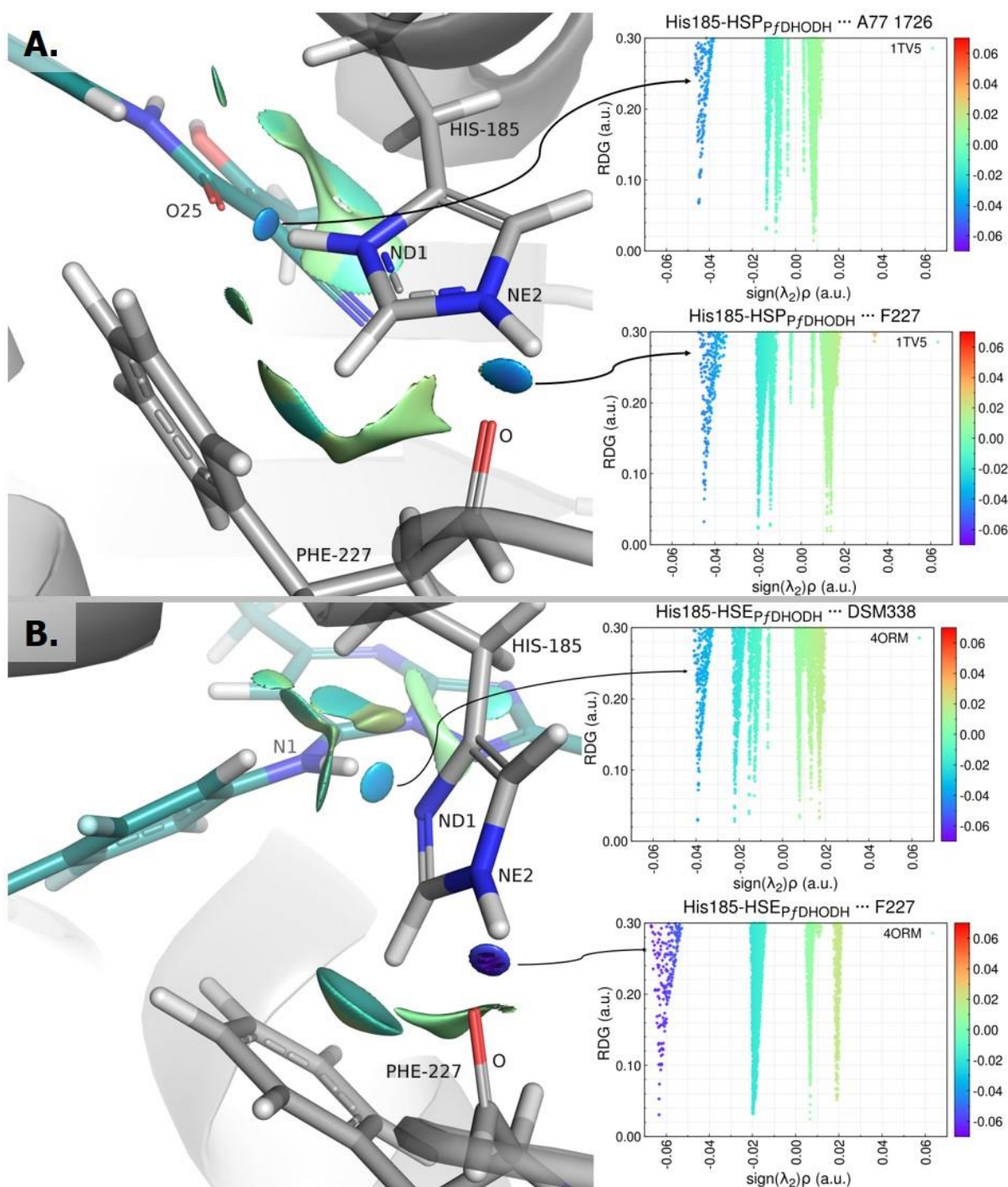


FIGURA 4.4 – Representação espacial das interações não-covalentes entre a His185 e a Phe227/inibidores cristalográficos. **A.** inibidor A77 1729 (PDB ID 1TV5, H185-HSP). **B.** inibidor DSM338 (PDB ID 4ORM, H185-HSE). As superfícies de NCI correspondem a valores do RDG = 0,30 a.u e a uma escala de cor arco-íris de  $-0,07 < \rho \text{ (a.u.)} < 0,07$ .

Fonte: elaborada pela autora.

Assim, simulações de *docking* molecular nas estruturas com PDB IDs 5DEL, 4ORM, 4CQ9, 4CQA, 3O8A e 1TV5 considerando o resíduo His185 nos estados de protonação HSE e HSP foram executadas. Após inspeção visual, observou-se que nas estruturas com PDB ID 1TV5, 3O8A e 4CQA (Phe188 “*para baixo*”, menor profundidade do sítio de ligação), as simulações foram inconclusivas.

Em contraste, no conjunto de estruturas com PDB ID 4CQ9, 4ORM e 5DEL, as simulações de *docking* foram satisfatórias, sobressaindo os resultados obtidos na estrutura com PDB ID 4ORM. Daqui em diante, unicamente os resultados obtidos nesta estrutura serão os discutidos.

No modo de ligação predito na estrutura com PDB ID 4ORM, o grupo indol dos derivados da indol-3-glioxiltirosina foi posicionado no fundo da cavidade correspondente ao sítio de ligação dos inibidores. Na maioria dos casos, o grupo  $-NH_{\text{indol}}$  encontrou-se orientado para o resíduo Met536. Os diferentes grupos  $-R$  ficaram parcialmente expostos ao solvente (Fig. 4.5).

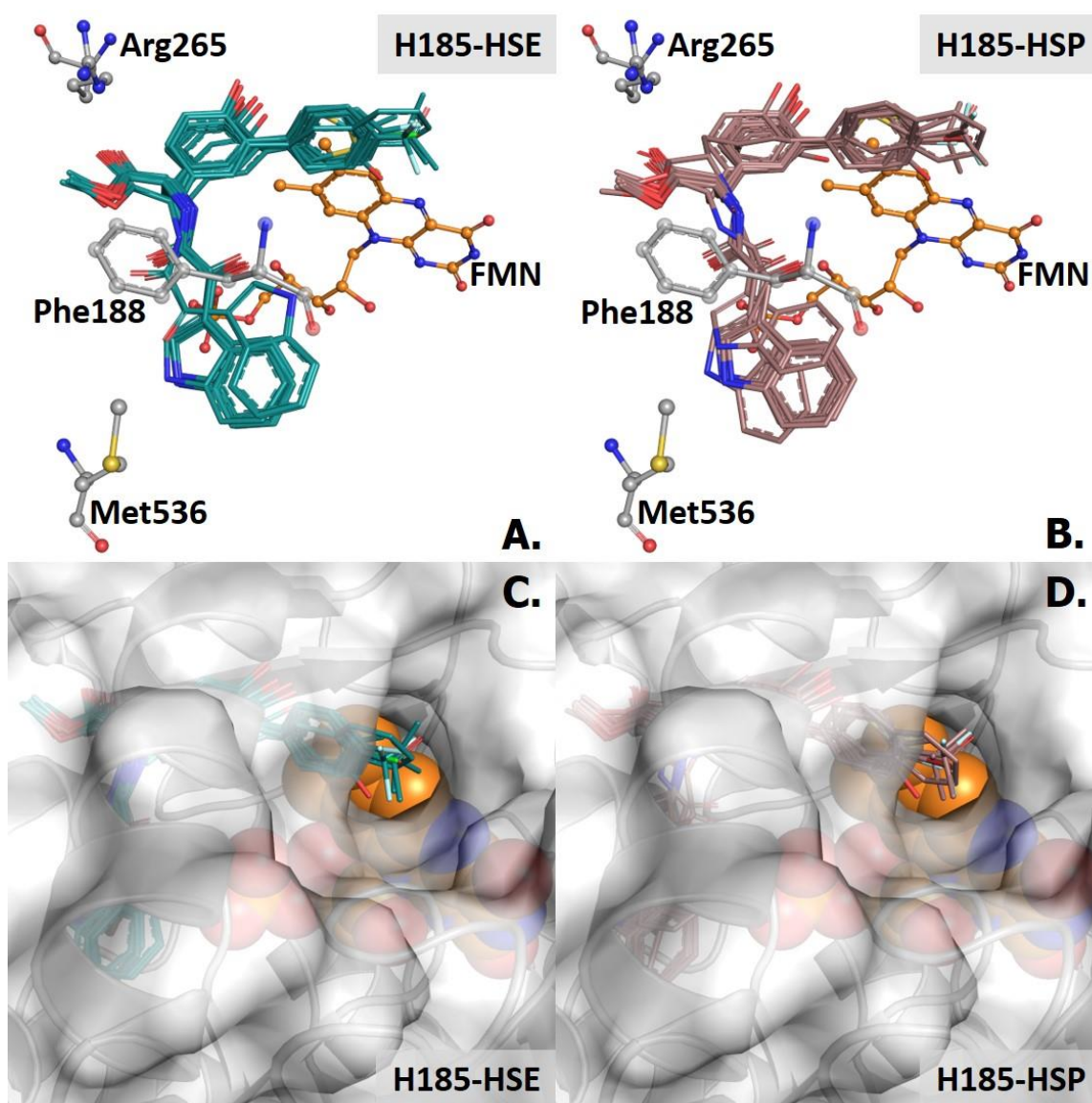
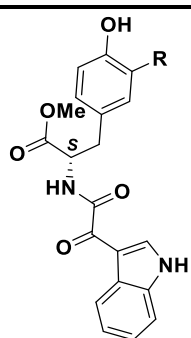


FIGURA 4.5 – Modo de ligação predito para os derivados da indol-3-glioxiltirosina após simulações de *docking* na estrutura da DHODHPf com PDB ID 4ORM. São apresentadas as poses obtidas considerando o resíduo His185 no tautômero HSE (A. e C.) e HSP (B. e D.). Os átomos de carbono do cofactor FMN são apresentados em laranja. Para maior clareza, os átomos de hidrogênios não são apresentados.

Fonte: elaborada pela autora.

A reprodutibilidade do posicionamento dos compostos dentro do sítio de ligação, indiferente do estado de protonação da His185, se reflete nos valores obtidos de deslocamento quadrático médio (RMSD, do inglês *root-mean-square deviation*). Compararam-se as poses obtidas para os mesmos nas duas configurações do receptor consideradas. Na maioria dos casos, este valor foi menor que 1,00 Å (Tabela 4.3).

TABELA 4.3 – Valores de RMSD comparativos e pontuações associadas às poses selecionadas para análise após simulações de *docking* na estrutura da DHODHPf com PBD ID 4ORM.

Composto	-R	Pontuação ChemPLP		RMSD <sup>†</sup> (Å)	
		His185-HSE	His185-HSP		
	<b>6a</b>	Ph	59,3	62,4	0,49
	<b>6b</b>	4-F-Ph	64,3	68,1	0,80
	<b>6c</b>	4-Cl-Ph	64,7	66,6	0,63
	<b>6d</b>	4-Br-Ph	68,5	68,1	0,25
	<b>6e</b>	α-Metiltiofeno	69,9	70,4	0,19
	<b>6f</b>	Tiofeno	68,2	64,9	0,77
	<b>6h</b>	4-C(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> -Ph	67,1	61,7	1,84
	<b>6i</b>	3-OH-Ph	66,7	68,7	0,27
	<b>6j</b>	Naftil	68,2	78,0	1,49
	<b>6k</b>	4-COCH <sub>3</sub> -Ph	71,6	70,9	0,37
	<b>6l</b>	4-CF <sub>3</sub> -Ph	77,2	73,8	0,45
<b>DSM338<sup>††</sup></b>			115,7	110,7	0,11

<sup>†</sup> Grupo de referência: átomos não-hidrogênios. <sup>††</sup> Resultados das simulações de *redocking*. As mesmas validam o experimento *in silico*.

Fonte: elaborada pela autora.

Note-se que a partir dos valores de pontuação avulsos, associados a cada uma das poses (Tabela 4.3), não é possível determinar o estado de protonação da His185 com o qual os compostos apresentariam uma maior afinidade pelo sítio de ligação. As interações não-covalentes receptor–ligante identificadas como comuns no modo de ligação predito e, representadas para o composto **6a** na Fig. 4.6, são:

- Interação  $\pi$  *edge-to-face* da forma-T entre a cadeia lateral da Phe227 (*edge*) e o grupo indol (*face*) dos ligantes. Não observada nas poses His185-HSE **6c**, e His185-HSP **6k** e **6j**.
- Para as simulações considerando a configuração His185-HSP, ligações de hidrogênio do tipo –NH...O envolvendo o átomo N $\delta^1$  da cadeia lateral da His185 (protonado, como grupo doador) e um dos átomos de oxigênio da porção oxoacetamida dos ligantes (grupo aceptor). Não observada para a pose do composto **6l**.

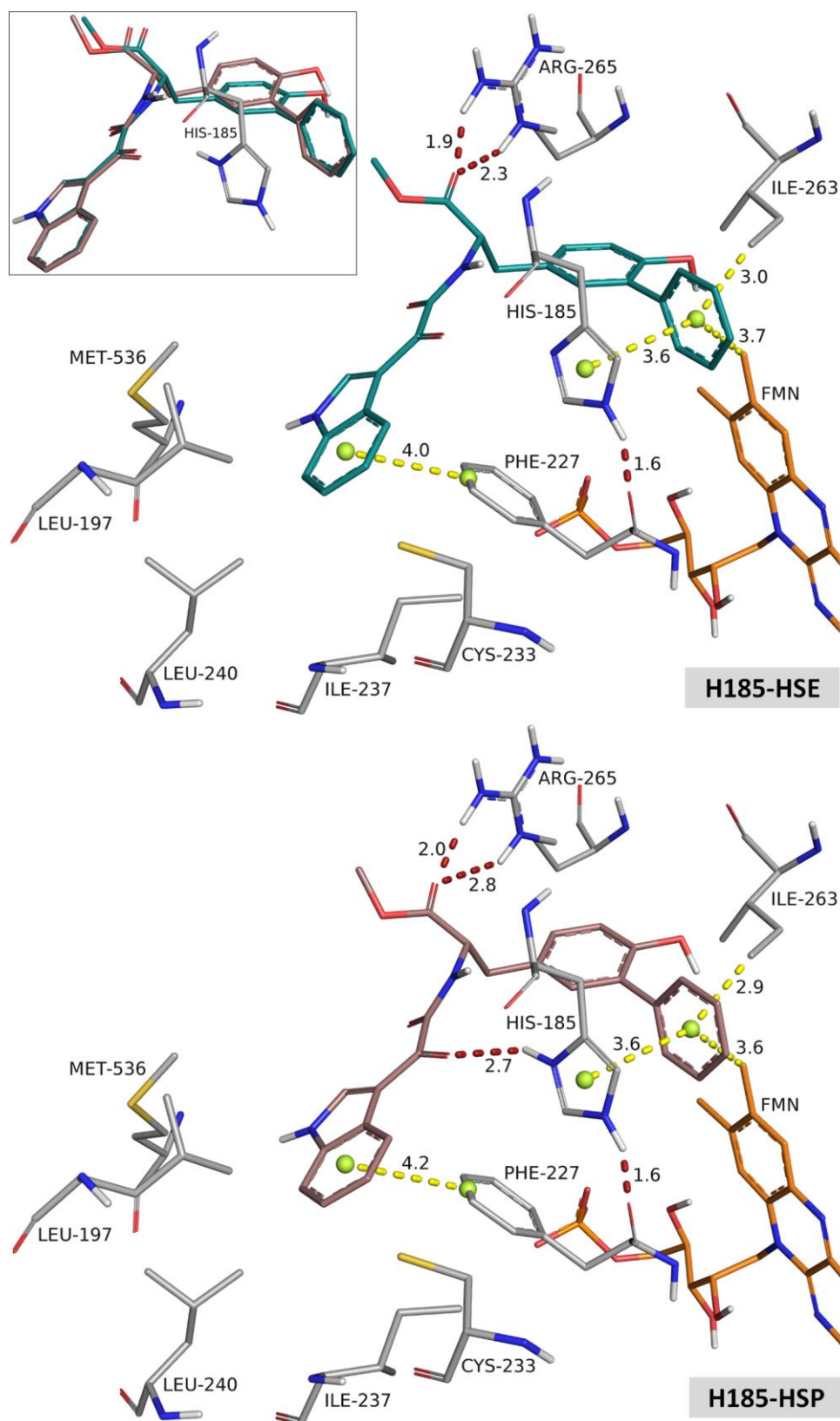


FIGURA 4.6 – Interações não-covalentes, representadas para o composto **6a**, estabelecidas pelo modo de ligação predito após simulações de *docking* dos derivados da indol-3-glioxiltirosina na estrutura da DHODHPf com PDB ID 4ORM. São apresentadas as poses de **6a** obtidas considerando o resíduo His185 no tautômero HSE (átomos de carbono em verde-azulado, topo) e HSP (átomos de carbono em violeta claro, parte inferior). Os átomos de carbono da enzima são apresentados em cinza e os do cofactor FMN, em laranja. As ligações de hidrogênio são apresentadas em vermelho. As interações envolvendo sistemas  $\pi$ , em amarelo. Distâncias em Å. Unicamente são apresentados os hidrogênios polares. *Inset*: sobreposição das poses de **6a**.

Fonte: elaborada pela autora.



- Ligações de hidrogênio do tipo  $\text{-NH}\cdots\text{O}$  envolvendo os átomos  $\text{N}_\epsilon$  e/ou  $\text{N}_{\eta^2}$  da cadeia lateral da Arg265 (protonados, como grupos doadores) e o ceto-oxigênio da função éster dos ligantes (grupo aceptor).

Destas interações comuns, aquelas com os resíduos Phe227 (interação- $\pi$ ) e com a Arg265 (HB), contribuiriam especialmente com o grau de afinidade dos compostos para o sítio de ligação (DENG et al., 2009). Já o HB com a His185, além de contribuir com a afinidade e potência dos inibidores, aumentaria a seletividade dos compostos sobre a DHODHPf frente a formas mamíferas da enzima (DENG et al., 2009). Simultaneamente, o posicionamento do grupo indol no fundo da cavidade, onde são encontrados os resíduos Leu189, Leu197, Phe227, Cys233, Ile237, Leu240 e Met536, é consistente com as orientações observadas para grupos não-polares de diferentes inibidores cristalográficos (SINGH et al., 2017).

As interações comuns identificadas para os diferentes grupos  $\text{-R}$  foram uma interação de empilhamento  $\pi$  envolvendo a cadeia lateral da His185 junto com interações  $\pi$ -alquil envolvendo a cadeia lateral da Ile263 e o grupo metila correspondente ao átomo C7M da porção *o*-xileno do FMN (Fig. 4.7). Estes grupos, parcialmente expostos ao solvente, foram posicionados no canal delimitado pelos resíduos Glu182, Gly226, Lys229, Arg262, Cys276 e Asn279 (Fig. 4.7). Os dados estruturais disponíveis até o momento, mostram que os inibidores conhecidos da DHODHPf não fazem interações com os resíduos desse canal. Ao avaliar as diferentes interações estabelecidas pelos diferentes grupos  $\text{-R}$  (Tabela 4.4), observou-se que nas poses dos compostos **6b** e **6d**, os quais exibiram os melhores resultados nos testes de atividade biológica, os grupos  $\text{-R}$  apresentam o menor número de interações com o seu entorno, assim como as poses dos compostos **6a**, **6c**, **6f** e **6j**.

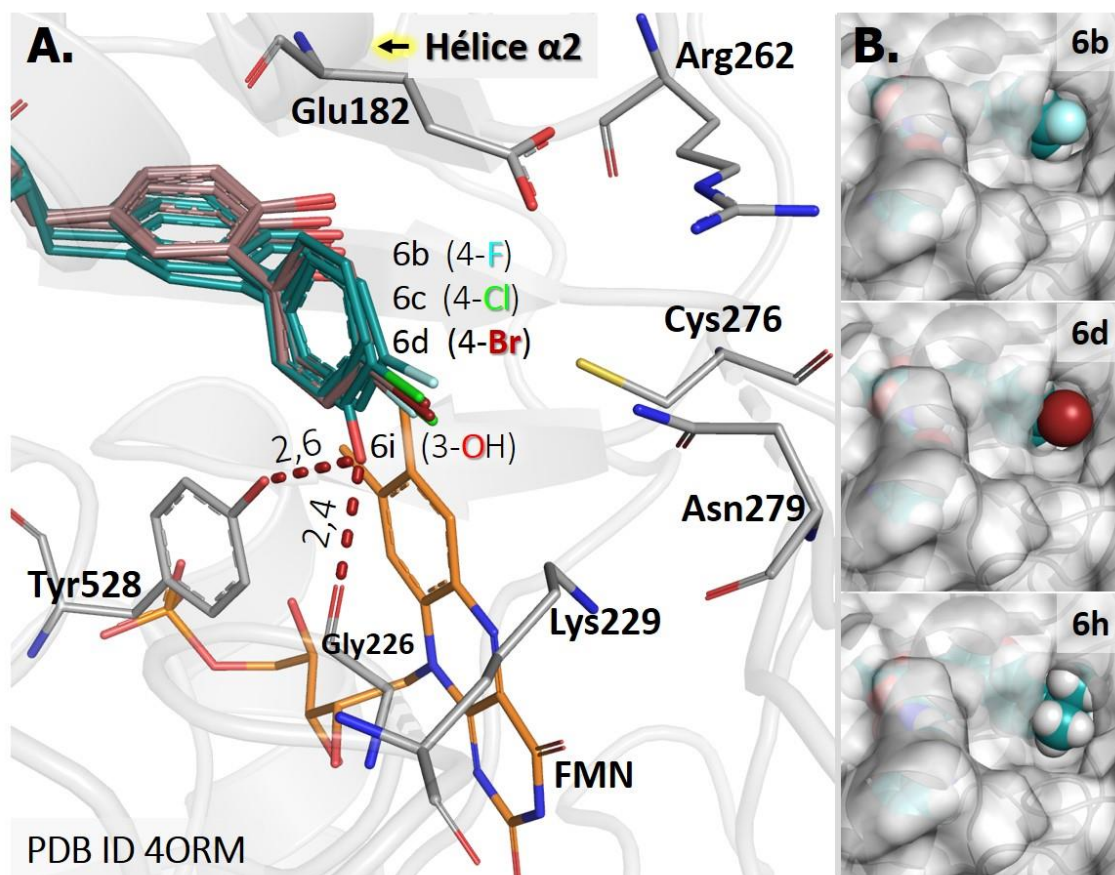


FIGURA 4.7 – Posicionamento dos grupos –R no modo de ligação predito para os compostos derivados da indol-3-glioxiltirosina após simulações de *docking* na estrutura da DHOHDPf com PDB ID 4ORM. **A.** Poses dos compostos **6b**, **6c**, **6d** e **6i**. Distâncias em Å. **B.** representação da estrutura da enzima em superfície e dos compostos **6b**, **6d** e **6h** no modelo de preenchimento do espaço.  
 Fonte: elaborada pela autora.

TABELA 4.4 Interações estabelecidas pelos diferentes grupos –R no modo de ligação predito após simulações de *docking* na estrutura da DHODHPf com PDB ID 4ORM.

Composto	-R	Glu182	Gly226	Lys229	Arg262	Cys276	Asn279	Tyr528
<b>6b</b>	4-F-Ph						vdW	
<b>6d</b>	4-Br-Ph			vdW			vdW	
<b>6c</b>	4-Cl-Ph			vdW			vdW	
<b>6i</b>	4-CF <sub>3</sub> -Ph	vdW	vdW	vdW			vdW	
<b>6a</b>	Ph							
<b>6k</b>	4-COCH <sub>3</sub> -Ph		vdW	vdW			HB	
<b>6j</b>	Naftil			vdW			vdW	
<b>6e</b>	$\alpha$ -Metiltiofeno	vdW			vdW			
<b>6h</b>	4-C(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> -Ph	vdW	vdW	vdW		vdW	vdW	
<b>6f</b>	Tiofeno							
<b>6i</b>	3-OH-Ph		HB					HB

vdW = van der Waals. HB = ligação de hidrogênio.

Fonte: elaborada pela autora.

Os complexos DHODHP<sub>H185-HSE</sub>-ORO-FMN-**6a** e DHODHP<sub>H185-HSP</sub>-ORO-FMN-**6a**<sup>a</sup>, foram selecionados para executar o refinamento empregando simulações de dinâmica molecular (DM). Para cada sistema, geraram-se três trajetórias independentes de 100 ns cada a uma temperatura de 310 K e 1 atm de pressão.

Em nenhuma das trajetórias obtidas observaram-se alterações estruturais da enzima, de acordo com i) a evolução no tempo do raio de giro (Rg)<sup>b</sup> e do RMSD<sup>c</sup> dos carbonos- $\alpha$ , frente as suas posições iniciais (Fig. 4.8) e ii) a estabilidade no tempo da estrutura secundária (Fig. 4.9). Ao monitorar o sítio de ligação dos inibidores, foi observado o movimento ascendente da hélice  $\alpha_2$  (Fig. 4.8). Tal movimento, aumenta a largura do canal onde reside o grupo -R, aumentando o grau de exposição ao solvente do mesmo.

---

<sup>a</sup> O composto **6a** foi escolhido como referência por representar o *scaffold* comum dos compostos de maior potência (**6b** e **6d**).

<sup>b</sup> O raio de giro (Rg) é definido como a distribuição dos átomos da proteína, em torno ao centro de massa da mesma:

$$R_g(t) = \left( \frac{1}{M} \sum_{i=1}^N m_i (\mathbf{r}_i(t) - R)^2 \right)^{1/2}$$

Onde  $M$ , é a massa da proteína;  $m_i$ , a massa do  $i$ -ésimo átomo;  $\mathbf{r}_i$ , a posição do  $i$ -ésimo átomo no instante de tempo  $t$  e  $R$ , o centro de massa da proteína conformada por  $N$  átomos. O raio de giro reflete a compactação de uma proteína (SNEHA; GEORGE PRIYA DOSS, 2016).

<sup>c</sup> Deslocamento quadrático médio (RMSD) é a raiz do desvio na posição observado para um átomo frente a sua posição de referência:

$$RMSD(t) = \left( \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N (\mathbf{r}_i(t) - \mathbf{r}_i^{ref})^2 \right)^{1/2}$$

Onde  $N$ , é o número de átomos constituintes dos sistema;  $\mathbf{r}_i$ , a posição do  $i$ -ésimo átomo no instante de tempo  $t$  e  $\mathbf{r}_i^{ref}$ , a posição do  $i$ -ésimo átomo no instante escolhido como referência. A representação gráfica dos valores de RMSD reflete possíveis variações que ocorrem ao longo da simulação. O RMSD de todos os átomos C $\alpha$ , é considerado o critério central para medir a convergência (SNEHA; GEORGE PRIYA DOSS, 2016).

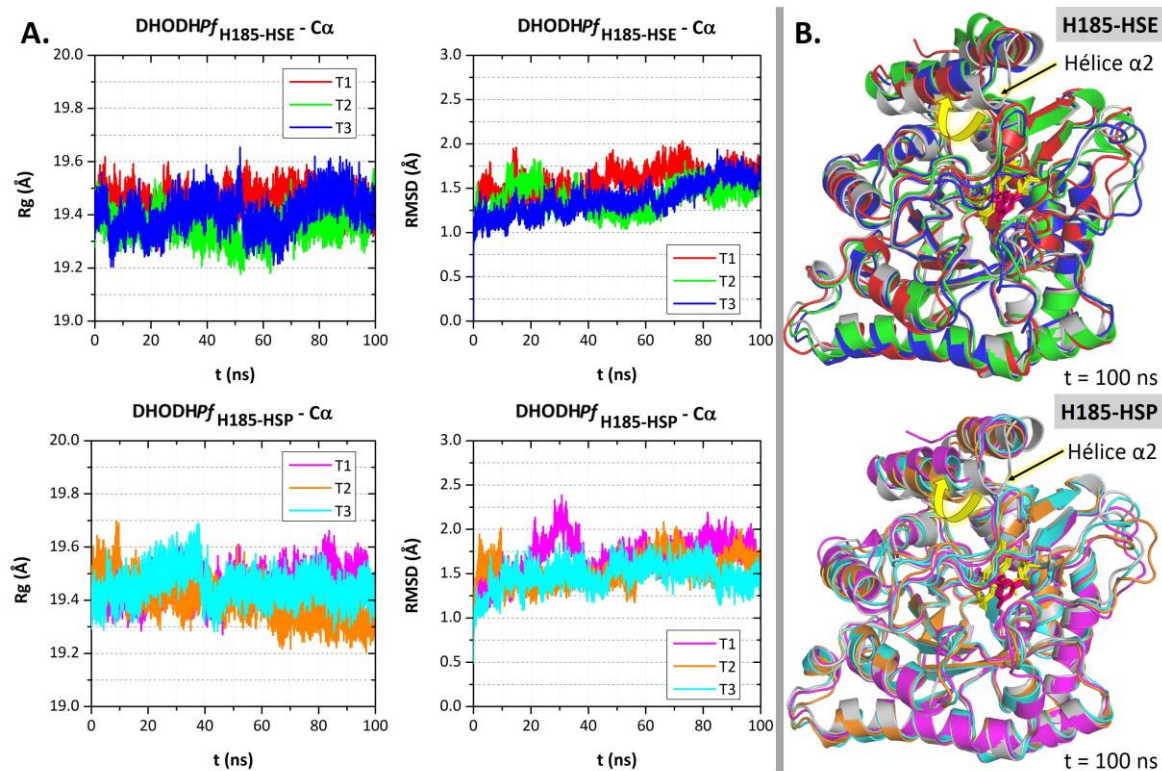


FIGURA 4.8 – Evolução temporal de algumas das características estruturais da DHODHPf nas simulações de DM dos complexos DHODHPf<sub>H185-HSE</sub>-ORO-FMN-6a (topo) e DHODHPf<sub>H185-HSP</sub>-ORO-FMN-6a (parte inferior). **A.** Rg (primeira coluna) e RMSD (segunda coluna) dos átomos carbono- $\alpha$  nas trajetórias obtidas para os complexos. **B.** Sobreposição dos complexos em t = 100 ns. A estrutura em cinza corresponde à estrutura cristalográfica (PDB ID 4ORM). Cada cor corresponde a uma simulação diferente. O movimento ascendente observado para a hélice  $\alpha$ 2 é destacado.

Fonte: elaborada pela autora.

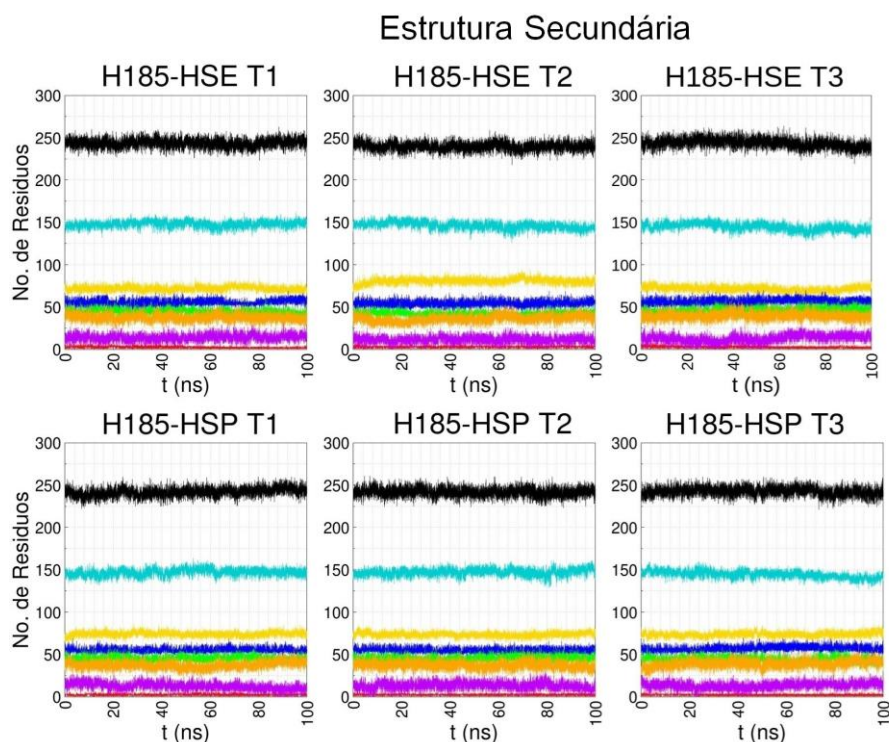


FIGURA 4.9 – Evolução temporal da estrutura secundária da DHODHPf nas trajetórias independentes obtidas para os complexos DHODHPf<sub>H185-HSE</sub>-ORO-FMN-6a (topo) e DHODHPf<sub>H185-HSP</sub>-ORO-FMN-6a (parte inferior). Grupo de referência: átomos não-hidrogênios da enzima.

Fonte: elaborada pela autora.

Como esperado, os ligantes ORO e FMN permaneceram no modo de ligação cristalográfico nas diferentes trajetórias, de acordo com i) a evolução temporal do RMSD dos átomos não-hidrogênios dos mesmos, em função das suas posições iniciais, nos que são registrados valores menores ou iguais a 1,0 Å (Fig. 4.10), e ii) os gráficos de distribuição de tais valores de RMSD onde um único pico é observado (Fig. 4.11). Na terceira réplica (T3) da DM do complexo  $DHODHPf_{H185-HSE-ORO-FMN-6a}$ , foi observada uma rotação de quase 180° do grupo carboxila de ORO (Fig. 4.10-A), o que gera, desde o ponto de vista químico, um modo de ligação equivalente ao original.

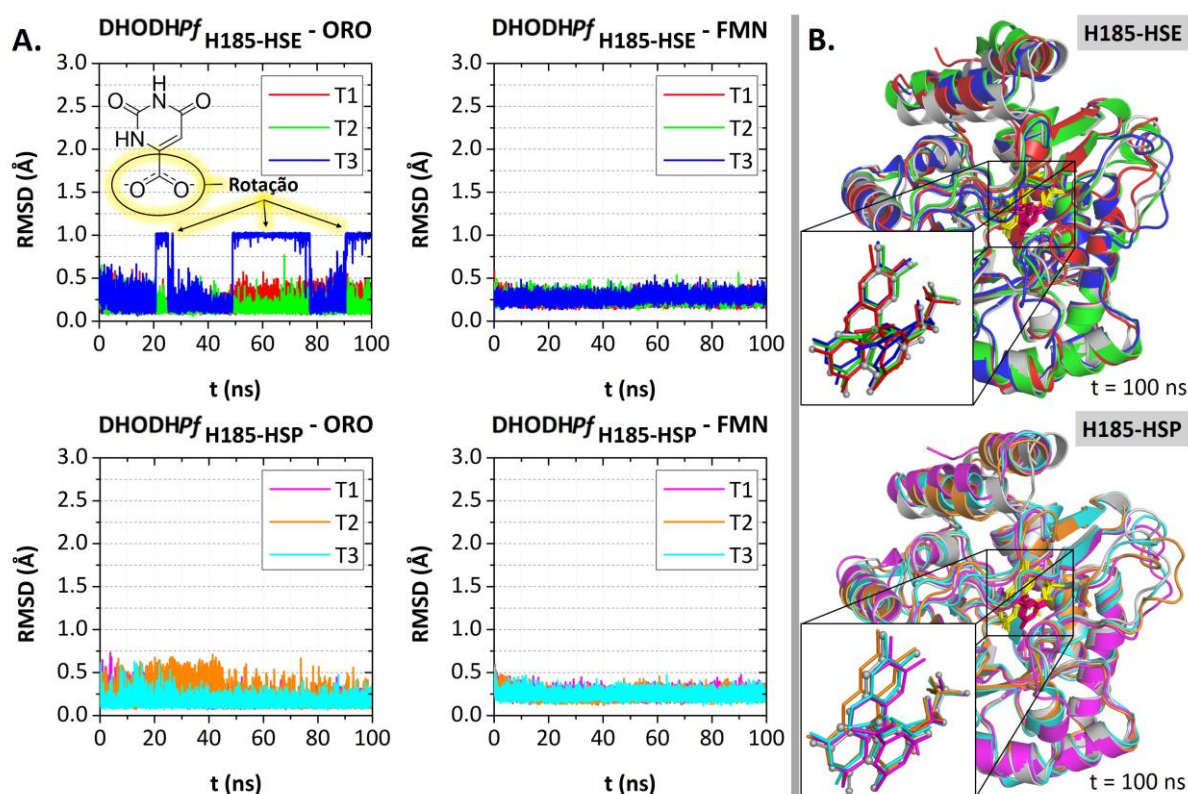


FIGURA 4.10 – Evolução temporal dos ligantes ORO e FMN nas simulações de DM dos complexos  $DHODHPf_{H185-HSE-ORO-FMN-6a}$  (topo) e  $DHODHPf_{H185-HSP-ORO-FMN-6a}$  (parte inferior). **A.** Evolução temporal dos RMSDs dos átomos não-hidrogênios de ORO (primeira coluna) e FMN (segunda coluna). Referência: Posições iniciais dos átomos não-hidrogênios de cada ligante. **B.** Sobreposição dos complexos em  $t = 100$  ns. A estrutura em cinza corresponde à estrutura cristalográfica (PDB ID 4ORM). Cada cor corresponde a uma simulação diferente. São destacadas as conformações dos ligantes ORO e FMN.

Fonte: elaborada pela autora.

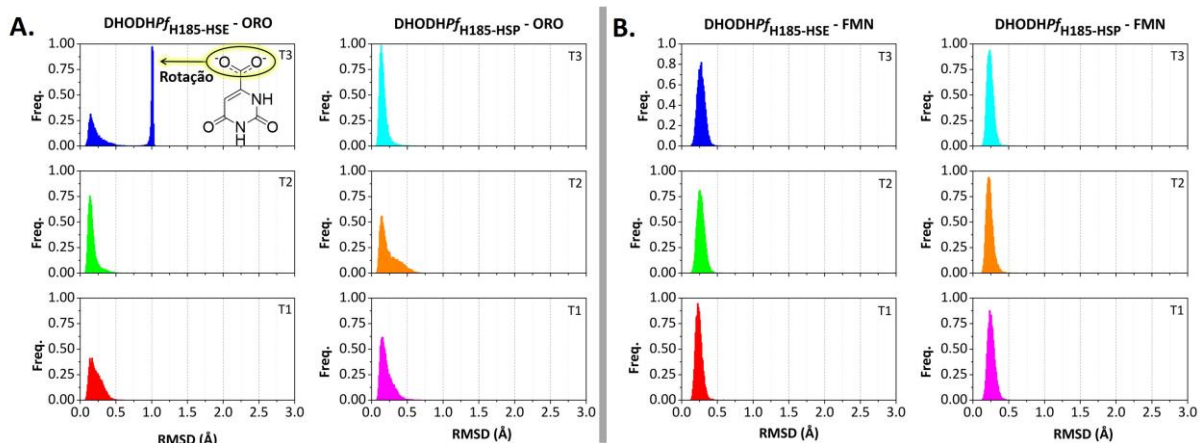


FIGURA 4.11 – Distribuições normalizadas dos valores de RMSD registrados para os átomos não-hidrogênios dos ligantes cognato ORO (A.) e FMN (B.) nas simulações de DM dos complexos DHODHP<sub>f</sub>H185-HSE-ORO-FMN-**6a** (primeira coluna de cada painel) e DHODHP<sub>f</sub>H185-HSP-ORO-FMN-**6a** (segunda coluna de cada painel). Referência: Posições iniciais dos átomos não-hidrogênios de cada ligante. Cada cor corresponde a uma simulação diferente.

Fonte: elaborada pela autora.

Ao monitorar **6a**, observou-se que o mesmo permaneceu no sítio de ligação dos inibidores, adotando conformações próximas ao modo de ligação predito nas simulações de *docking*, como mostrado pela evolução temporal do RMSD dos átomos não-hidrogênios do mesmo, em função das suas respectivas posições iniciais, o qual não ultrapassou os 2,0 Å na maioria do tempo simulado (Fig. 4.12, A. e C.) (LIU; KOKUBO, 2017; RAMÍREZ; CABALLERO, 2018). O perfil das distribuições do RMSD (Fig. 4.12, C.), aponta que **6a** apresentou as maiores flutuações na sua conformação nas trajetórias T2 e T3 considerando a H185-HSP. Análises de agrupamento (*clusters*) tomando como referência os átomos não-hidrogênios de **6a** revelaram que a ocupação no tempo da principal conformação adotada pelo composto foi superior o igual ao 75% do tempo simulado, tomando como valor de corte na diferença de RMSD 1,0 Å (Tabela 4.5) (FRIEDRICH; SIMSIR; KIRCHMAIR, 2018).

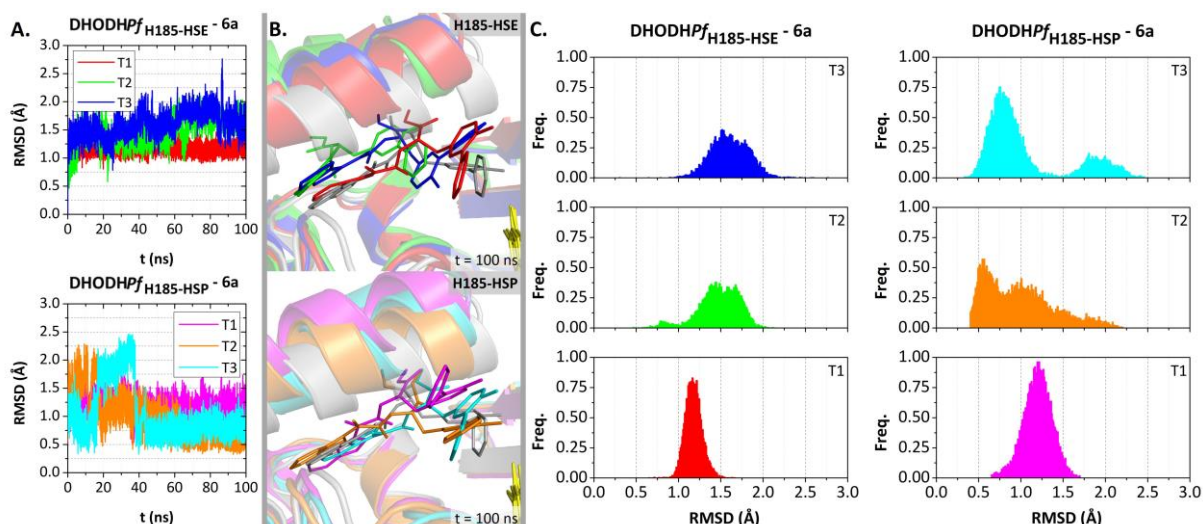


FIGURA 4.12 – Evolução temporal do composto **6a** nas simulações de DM dos complexos DHODHPf<sub>H185-HSE</sub>-ORO-FMN-**6a** e DHODHPf<sub>H185-HSP</sub>-ORO-FMN-**6a**. **A.** Evolução temporal do RMSD dos átomos não-hidrogênios do composto **6a**. Referência: Posições iniciais dos átomos não-hidrogênios. Cada cor corresponde a uma simulação diferente. **B.** Sobreposição dos complexos em t = 100 ns destacando as conformações do composto **6a**. Em cinza, é apresentada a estrutura cristalográfica e a pose predita nas simulações de *docking* (PDB ID 4ORM). **C.** Distribuições normalizadas dos valores de RMSD apresentados em Å.

Fonte: elaborada pela autora.

TABELA 4.5 – Ocupação no tempo (%) da conformação principal adotada por **6a** durante as simulações de DM dos complexos DHODHPf<sub>H185-HSE</sub>-ORO-FMN-**6a** e DHODHPf<sub>H185-HSP</sub>-ORO-FMN-**6a**.

Sistema		
Trajectoria	His185-HSE	His185-HSP
T1	99,9	98,0
T2	77,8	81,5
T3	89,4	75,0

Fonte: elaborada pela autora.

O número de contatos de curto alcance enzima...ligantes (resíduos em até 4 Å dos ligantes), permaneceu constante nas seis trajetórias (Tabela 4.6). Ao avaliar as interações tipo ligação de hidrogênio DHODHPf-**6a** (Tabela 4.7), foi observado que, no sistema considerando a His185-HSP, o HB predito no *docking* com a cadeia lateral do resíduo His185 é perdido, enquanto que, aquele com o resíduo Arg265 apresentou uma ocupação média de 13% ± 9% (o valor do desvio padrão indica que o mesmo tende a não ser estável devido a sua baixa reprodutibilidade). Em contraste, no sistema considerando a His185-HSE, **6a** estabeleceu uma ligação de hidrogênio com átomo N<sub>δ</sub><sup>1</sup> do resíduo His185 mediante a função -NH<sub>amida</sub> (ocupação média de 16% ± 3%), e aquele com o resíduo Arg265 é perdido. Em ambos os casos, observou-se uma ligação de hidrogênio envolvendo o átomo de oxigênio da cadeia principal da Leu531 e o -NH<sub>indol</sub> dos compostos, interação não observada nas simulações de *docking*.

TABELA 4.6 – Número de contatos ( $d < 4 \text{ \AA}$ ) enzima...ligantes presentes durante as simulações de DM dos complexos DHODHP<sub>f</sub><sub>H185-HSE</sub>-ORO-FMN-**6a** e DHODHP<sub>f</sub><sub>H185-HSP</sub>-ORO-FMN-**6a**. Em parênteses é apresentado o desvio padrão.

	ORO	FMN	6a
	<b>His185-HSE</b>		
<b>T1</b>	20 (4)	37 (4)	15 (4)
<b>T2</b>	21 (3)	37 (5)	12 (4)
<b>T3</b>	20 (3)	37 (5)	13 (4)
<b>Média</b>	20 (2)	37 (3)	13 (2)
	<b>His185-HSP</b>		
<b>T1</b>	20 (4)	34 (5)	13 (5)
<b>T2</b>	21 (3)	38 (5)	11 (4)
<b>T3</b>	22 (3)	36 (4)	17 (5)
<b>Média</b>	21 (2)	36 (3)	14 (3)

Fonte: elaborada pela autora.

TABELA 4.7 – Ocupação no tempo (%) das ligações de hidrogênio mais representativas enzima...**6a** estabelecidas durante as simulações de DM dos complexos DHODHP<sub>f</sub><sub>H185-HSE</sub>-ORO-FMN-**6a** e DHODHP<sub>f</sub><sub>H185-HSP</sub>-ORO-FMN-**6a**. Em parênteses é apresentado o desvio padrão.

Sistema	Grupos participantes			T1	T2	T3	Média (DP)
	Resíduo	6a					
His185-HSE	His185	Cadeia lateral	-NH <sub>amida</sub> (doador)	16	12	20	16 (3)
	Arg265	Cadeia lateral	-O <sub>ceto-ester</sub> (acceptor)	15	1	3	6 (6)
	Leu531	Cadeia principal	-NH <sub>indol</sub> (doador)	44	0	19	21 (18)
His185-HSP	Glu182	Cadeia lateral	-OH <sub>fenol</sub> (doador e acceptor)	4	15	81	33 (34)
	His185	Cadeia lateral	-O <sub>ceto-oxoacetoamide</sub> (doador)	0	1	3	2 (1)
	Arg265	Cadeia lateral	-O <sub>ceto-ester</sub> (acceptor)	1	16	23	13 (9)
	Leu531	Cadeia principal	-NH <sub>indol</sub> (doador)	35	11	29	25 (10)

Fonte: elaborada pela autora.

Uma análise mais detalhada das interações não-covalentes DHODHP<sub>f</sub>...**6a** foi realizada. Para isto, trabalhou-se com as estruturas mais representativas de cada trajetória, as quais foram identificadas nas análises de agrupamento (*cluster*) realizadas para determinar a ocupação no tempo da principal conformação adotada por **6a**. Os resultados são os sumarizados na Tabela 4.8. Pode-se observar que as interações de caráter  $\pi$  com os resíduos His185 e Phe227 são mantidas.



TABELA 4.8 – Resumo das principais interações não-covalentes, diferentes de ligações de hidrogênio, observadas nas estruturas mais representativas de cada uma das simulações de DM dos complexos DHODHP<sub>His185-HSE</sub>-ORO-FMN-**6a** e DHODHP<sub>His185-HSP</sub>-ORO-FMN-**6a**.

	L172	L176	G181	E182	C184	H185	F188	F227	K229	I237	I263	L531	V532	M536
<b>His185-HSE</b>														
<b>T1</b>		X	X		X	π	X	X	X			CHπ	X	CHπ
<b>T2</b>	X	X	X			π	CHπ	Tπ		CHπ		X	CHπ	X
<b>T3</b>	X		X		X	π	CHπ	CHπ	X	X		X	X	X
<b>His185-HSP</b>														
<b>T1</b>	X		X		X	CHπ	X	Tπ		X		X		CHπ
<b>T2</b>		X	X	X	X	CHπ	CHπ	Tπ			X		X	X
<b>T3</b>		X	X	X	X	π	X	X	X		X	CHπ	X	X

X = interações de van der Waals. π = interação de empilhamento-π. Tπ = interação de empilhamento-π na forma T. CHπ = interação -CH...π.

Fonte: Elaborada pela autora.

Tomando os resultados das simulações de *docking* e de dinâmica molecular, a diferença na atividade dos compostos derivados de indol-3-glioxil-tirosina pode ser explicada em função das diferenças nas energias livres de hidratação ( $\Delta G_{\text{Hidratação}}$ ) dos grupos -R, os quais ficam expostos ao solvente. Grupos -R de menor  $\Delta G_{\text{Hidratação}}$  (valores mais negativos, i.e., interações mais estáveis com o solvente), contribuiriam a uma maior estabilidade do modo de ligação. Assim, por exemplo, as energias livres de hidratação experimentais dos grupos -R dos compostos **6b** (-R = 4-F-Ph) e **6d** (-R = 4-Br-Ph) são -0,86 e -1,46 kcal·mol<sup>-1</sup>, respectivamente, enquanto o valor para o grupo -R de **6h** (4-C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>-Ph) é de -0,44 kcal·mol<sup>-1</sup> (Tabela 4.9).

TABELA 4.9 – Valores de energia livre de hidratação ( $\Delta G_{\text{Hidratação}}$ ) dos derivados do benzeno correspondentes aos grupos -R dos compostos derivados da indol-3-glioxiltirosina (I3GT) **6b**, **6d**, **6c**, **6a** e **6h**.

Composto		$\Delta G_{\text{Hidratação}}$ (kcal·mol <sup>-1</sup> )	Derivado I3GT	-R	
Fluorobenzeno	F-Ph	-0,80	Aumento da atividade ↑	<b>6b</b>	4-F-Ph
Bromobenzeno	Br-Ph	-1,46		<b>6d</b>	4-Br-Ph
Clorobenzeno	Cl-Ph	-1,12		<b>6c</b>	4-Cl-Ph
Benzeno	Ph	-0,86		<b>6a</b>	Ph
t-Butilbenzeno	C(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> -Ph	-0,44		<b>6h</b>	4-C(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> -Ph

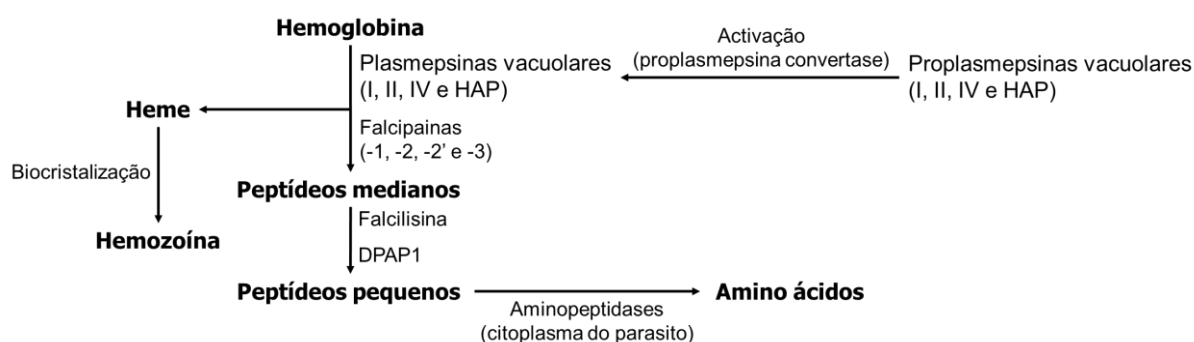
Fonte: elaborada pela autora com base em ABRAHAM et al., 1990 e RIZZO et al., 2006.

Em suma, estes resultados respaldam a escolha da proteína DHODHP como o possível alvo dos compostos derivados da indol-3-glioxiltirosina. Os valores de atividade biológica observada para os derivados concordam com os dados estruturais e a literatura disponível. Inibidores que não interagem via ligação de hidrogênio com a cadeia lateral da His185, apresentam baixa atividade antiparasitária

*in vitro* contra o estágio intra-eritrocítico de *P. falciparum*. Exemplo disso, são os compostos IDI-6253 e IDI-6273 (inibidores presentes nas estruturas com PDB ID 4CQ9 e 4CQA respetivamente, Tabela 4.2). Por outro lado, inibidores que interagem fortemente mediante ligações de hidrogênio com as cadeias laterais dos resíduos His185 e Arg265 apresentam alta atividade antimalárica *in vitro* contra o estágio intra-eritrocítico de *P. falciparum*. Este comportamento é o observado para o DSM338 (inibidor cristalográfico da estrutura com PDB ID 4ORM, Tabela 4.2) e outros inibidores derivados da triazolopirimidina, onde a ressonância permite fortalecer os HB devido à redistribuição de carga (DENG et al., 2009). Os nossos resultados posicionam os derivados de indol-3-glioxiltirosina no intermédio entre estes dois tipos de ligantes.

## 4.2 – Avaliação das plasmepsinas vacuolares de *P. falciparum*

As plasmepsinas são uma família de pelo menos dez proteases<sup>d</sup> aspárticas do *Plasmodium falciparum*. Destas, as isoformas plasmepsina I (PMI, E.C. 3.4.23.38), plasmepsina II (PMII, E.C. 3.4.23.39), plasmepsina IV (PMIV, E.C. 3.4.23.-) e a protease histo-aspártica (HAP, do inglês *histo-aspartic protease*, também conhecida como PMIII), localizam-se no vacúolo digestivo ácido (pH ~5) do parasito e participam na degradação da hemoglobina humana durante o estágio intra-eritrocítico da infecção (Esquema 4.3) (ERSMARK; SAMUELSSON; HALLBERG, 2006).



ESQUEMA 4.3 – Esquematização do processo de degradação (catabolismo) da hemoglobina pelo *P. falciparum* durante o estágio intra-eritrocítico da infecção.

Fonte: elaborada pela autora com base em ERSMARK; SAMUELSSON; HALLBERG, 2006.

<sup>d</sup> Enzimas que clivam ligações peptídicas.

As plasmepsinas vacuolares de *P. falciparum* apresentam um enovelamento característico das proteases tipo pepsina (Fig. 4.13-A), sendo monômeros funcionais (LIU; ISTVAN; GOLDBERG, 2006; RATHORE et al., 2020). Os inibidores das mesmas, ligam-se aos seus sítios ativos, os quais são fendas na interface dos domínios N- e C-terminal, onde se localiza a díade catalítica ácida (Fig. 4.13-A, B). Nas enzimas PMI, PMII e PMIV, a díade catalítica são dois resíduos de aspartato, aqui numerados como 36 e 216. Na HAP, a aspartato 36 é substituída por uma histidina<sup>e</sup>. Em todos os casos, a díade catalítica está rodeada por diferentes subsítios (Figs. 4.13-B e 4.14), nomeados segundo a nomenclatura Schechter-Berger. Um motivo alça- $\beta$  ( $\beta$ -*hairpin*), conhecido como *flap* (Fig. 4.13-A, B), cobre a díade catalítica. A sua função é a de facilitar a fixação dos substratos, podendo adotar conformações desde fechadas até abertas (Fig. 4.13-D).

---

<sup>e</sup> O mecanismo de reação da HAP não tem sido completamente elucidado. Em diferentes estudos, a histidina 36 tem se mostrado não-catalítica (NASAMU et al., 2020).

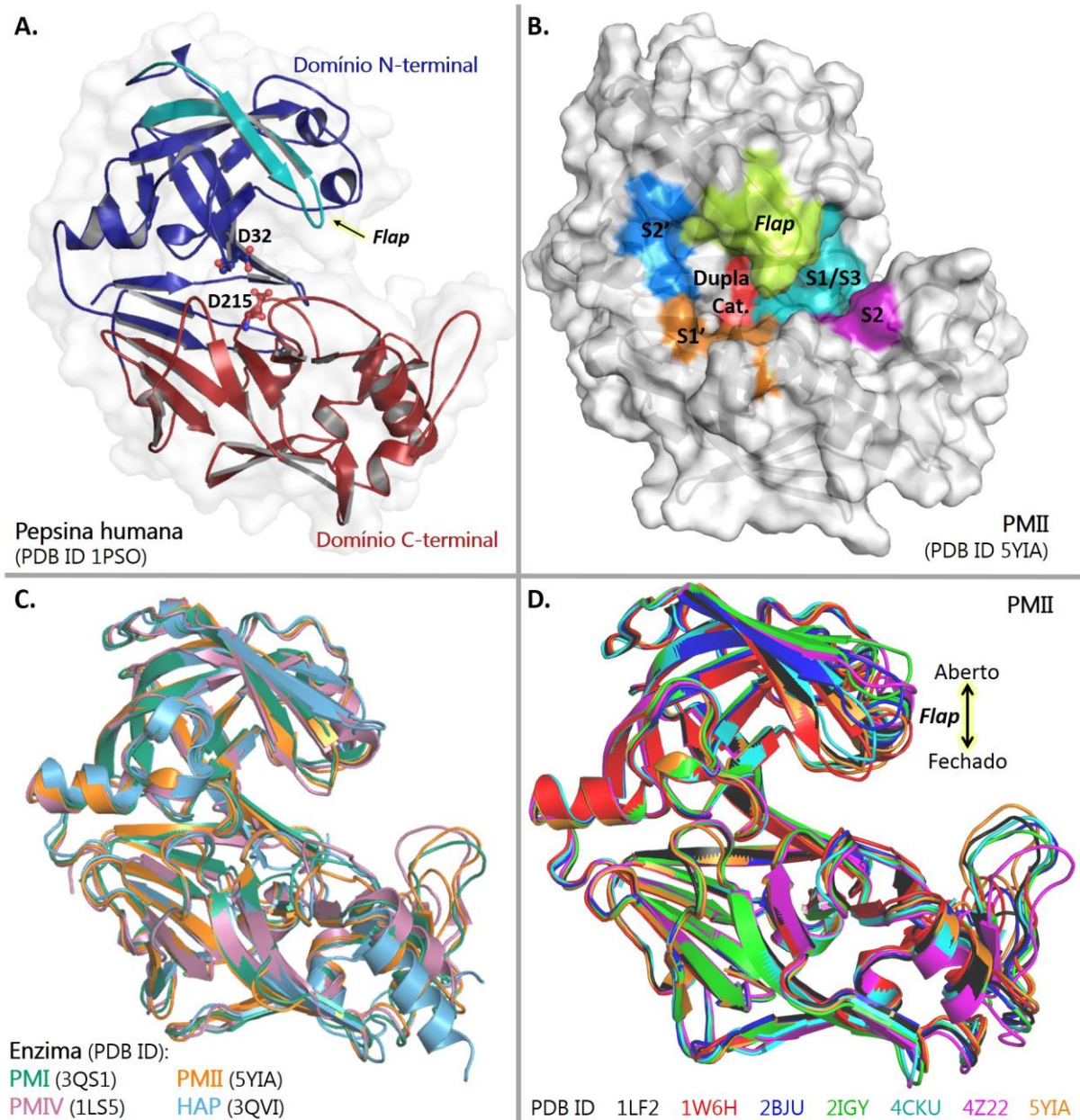
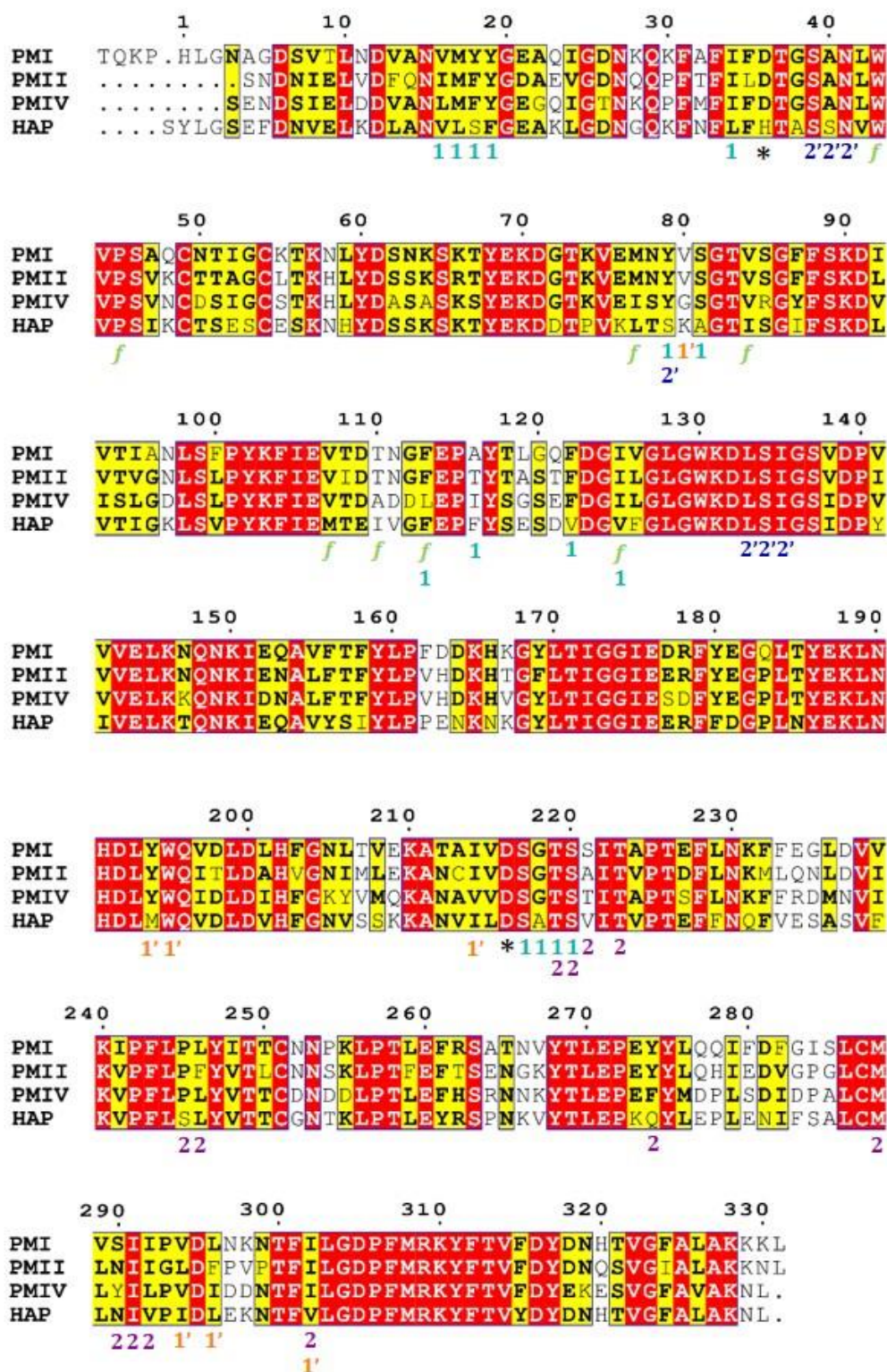


FIGURA 4.13 – Estrutura tridimensional da pepsina humana e das plasmepsinas vacuolares de *P. falciparum*. **A.** Estrutura terciária da pepsina, uma protease aspártica humana. Na mesma são assinalados os domínios N- e C-terminal (em azul e vermelho respetivamente), o motivo grampo- $\beta$  conhecido como *flap* (em ciano) e a posição da díade catalítica ácida, os resíduos Asp32 e Asp215 neste caso. **B.** Destaque dos diferentes subsítios em torno a díade catalítica (em vermelho) nas plasmepsinas vacuolares de *Pf* representadas para a PMII. **C.** e **D.** Sobreposição das estruturas da PMI, PMII, PMIV e HAP de *Pf* avaliadas mediante simulações de *docking*. Pode-se observar que nas mesmas o *flap* adota diferentes posições.

Fonte: elaborada pela autora.



\* ,Dupla catalítica.

Bolsos: *f*, *flap*; **1**, subsítio S1/S3; **2**, subsítio S2; **1'**, subsítio S1'; **2'**, subsítio S2'.

FIGURA 4.14 – Alinhamento das sequências das plasmepsinas vacuolares de *P. falciparum*. Quadros vermelhos com letras brancas representam uma identidade estrita entre resíduos. Caracteres pretos em negrito representam resíduos similares na mesma coluna. Caracteres entre quadros azuis preenchidos de amarelo representam similaridade entre os grupos. Encontram-se assinalados os resíduos da díade catalítica assim como aqueles dos subsítios S1/S3, S2, S1', S2' e do *flap*.

Fonte: elaborada pela autora com ajuda do servidor ESPript 3.0 (ROBERT; GOUET, 2014) com base em BHAUMIK et al., 2011 e HUIZING; MONDAL; HIRSCH, 2015.

Ao comparar as sequências das plasmegas vacuolares de *P. falciparum*, observam-se percentagens de identidade na faixa de 59-73% (Tabela 4.10). Quando comparados os sítios de ligação, a identidade com respeito a PMII é de 84%, 68% e 39% para PMI, PMIV e HAP respetivamente (COOMBS et al., 2001; ERSMARK; SAMUELSSON; HALLBERG, 2006). Estas similaridades, tanto no enovelamento como na identidade, refletem-se no fato de que é necessário inibir mais de uma protease vacuolar para combater o parasita (ERSMARK; SAMUELSSON; HALLBERG, 2006).

TABELA 4.10 – Percentagem de identidade entre as sequências das enzimas PMI, PMII, PMIV e HAP de *P. falciparum*.

	PMI	PMII	PMIV	HAP
PMI	--	73	70	64
PMII	73	--	69	60
PMIV	70	69	--	59
HAP	64	60	59	--

Identidade: Extensão em que duas sequências têm os mesmos resíduos nas mesmas posições em um alinhamento, frequentemente expressas como uma percentagem.

Fonte: Elaborada pela autora com base nos resultados obtidos após alinhamento no servidor BLAST (ALTSCHUL, 1997; ALTSCHUL et al., 2005; valores  $E \leq 7 \cdot 10^{-166}$ ) das sequências no formato FASTA disponíveis no Banco de Dados de Proteínas para as estruturas da PMI, PMII, PMIV e HAP com PDB IDs 3QS1, 5YIA, 1LS5 e 3FNU respetivamente.

No total, ligadas a um inibidor, encontraram-se depositadas no PDB 1 estrutura de PMI, 19 estruturas de PMII, 1 estrutura de PMIV e 3 estruturas de HAP (Tabela 4.11).

TABELA 4.11 – Códigos de identificação (PDB IDs) e resolução das estruturas das plasmepsinas vacuolares consideradas. Para cada PDB ID, é apresentado o respectivo código do inibidor cristalográfico junto com os valores *in vitro* de  $K_i$  e  $IC_{50}$  na enzima e de  $EC_{50}$  na linhagem 3D7 de *Pf* quando disponíveis.

Estrutura		Inibidor			$K_i$ na Enzima (nM)	$IC_{50}$ na Enzima ( $\mu$ M)	3D7 $EC_{50}$ ( $\mu$ M)	Ref.
PDB ID	Res. (Å)	ID PDB/Ref.	Tipo <sup>††</sup>					
<b>PMI</b>								
3QS1	3,10	006/ KNI-10006	PM	11,0	0,28	--	BHAUMIK et al., 2011	
<b>PMII</b>								
5YIE	2,1	8VF/ KNI-10742	PM	5,6	--	--		
5YID	2,1	K95/ KNI-10395	PM	4,0	--	--		
5YIC	1,9	8VO/ KNI-10333	PM	1,3	--	0,93	MISHRA et al., 2018	
5YIB	2,15	8VC/ KNI-10743	PM	3,3	--	0,43		
5YIA	2	8V9/ KNI-10343	PM	3,0	--	--		
4Z22	2,62	4KG/ 2R,5S-3b	NPM	--	0,34	--	RASINA et al., 2016	
4YA8	3,3	49W/ PG394	NPM	--	0,8	--	RECACHA et al., 2015	
4Y6M	2,27	48Q/ PG418	NPM	--	0,070	--		
4CKU	1,85	P2F/ 1SR	NPM	--	0,15	0,002	JAUDZEMS et al., 2014	
2IGY	2,6	A2T/ 18	NPM	--	0,113	--	BOSS et al., 2006	
2IGX	1,7	A1T/ 22	NPM	--	0,054	--		
2BJU	1,56	IH4/ 1	NPM	--	0,034	--	PRADE et al., 2005	
1XE6	2,8	5FP	P	--	--	--	n.d.	
1XE5	2,4	5FE	P	--	--	--	n.d.	
1W6H	2,24	TIT/ 1	P	--	0,0022	--	JOHANSSON et al., 2005	
1ME6	2,7	IVS	P	--	--	--	n.d.	
1LF3	2,7	EH5/ EH58	NPM	--	0,100	--	ASOJO et al., 2003	
1LF2 <sup>†</sup>	1,8	R37/ rs370	NPM	--	0,030	--	ASOJO et al., 2002	
1LEE <sup>†</sup>	1,9	R36/ rs367	NPM	--	0,018	--		

(Continua)

(Continuação)

Estrutura		Inibidor					Ref.
PDB ID	Res. (Å)	ID PDB/Ref.	Tipo <sup>††</sup>	K <sub>i</sub> na Enzima (nM)	IC <sub>50</sub> na Enzima (µM)	3D7 EC <sub>50</sub> (µM)	
<b>PMIV</b>							
1LS5	2,8	Pepstatin/ Pepstatin A	P	--	--	--	ASOJO et al., 2003
<b>HAP</b>							
3QVI	2,50	K95/ KNI-10395	PM	--	--	--	BHAUMIK et al., 2011b
3FNT	3,30	Pepstatin/ Pepstatin A	P	--	0,002	--	BHAUMIK et al., 2009 e FRIEDMAN; CAFLISCH, 2009
3FNU	3,00	006/ KNI-10006	PM	--	0,69	--	

<sup>†</sup> Mutante M205S. <sup>††</sup> P = peptídico. PM = peptidomimético. NPM = não-peptidomimético. n.d.= não disponível.

Fonte: elaborada pela autora com base nas referências apresentadas na última coluna da tabela.

Nas estruturas de PMI e PMIV, em 18/19 estruturas de PMII e na estrutura da HAP em complexo com pepstatina A (PDB ID 3FNT), observou-se ligações de hidrogênio entre os inibidores (do tipo peptídicos, peptidomiméticos e não-peptidomiméticos) e a díade catalítica, interação chave para inibir estas enzimas (HUIZING; MONDAL; HIRSCH, 2015). Na estrutura da PMII com PDB ID 2IGY e na estrutura da HAP com PDB ID 3QVI, a interação do inibidor com a díade catalítica encontra-se mediada pela molécula de água estrutural conhecida como W1, essencial para a catálise. Na estrutura da HAP com PDB ID 3FNU, não há interação de ligação de hidrogênio, direta ou mediada, entre o inibidor e a díade catalítica.

Assim, simulações de *docking* molecular foram realizadas nas cadeias A das diferentes estruturas disponíveis da PMI, PMIV e HAP e nas estruturas da PMII com PDB IDs 1LF2, 1W6H, 2BJU, 2IGY (com e sem a molécula de água estrutural W1), 4CKU, 4Z22 e 5YIA, um subconjunto das 19 estruturas que consegue representar as diferentes conformações observadas para sítio de ligação, especialmente para o *flap* (Fig. 4.13-D) (HUIZING; MONDAL; HIRSCH, 2015; SILVA et al., 1996). As estruturas bidimensionais dos inibidores presentes nas estruturas avaliadas, são apresentadas na Fig. 4.15.



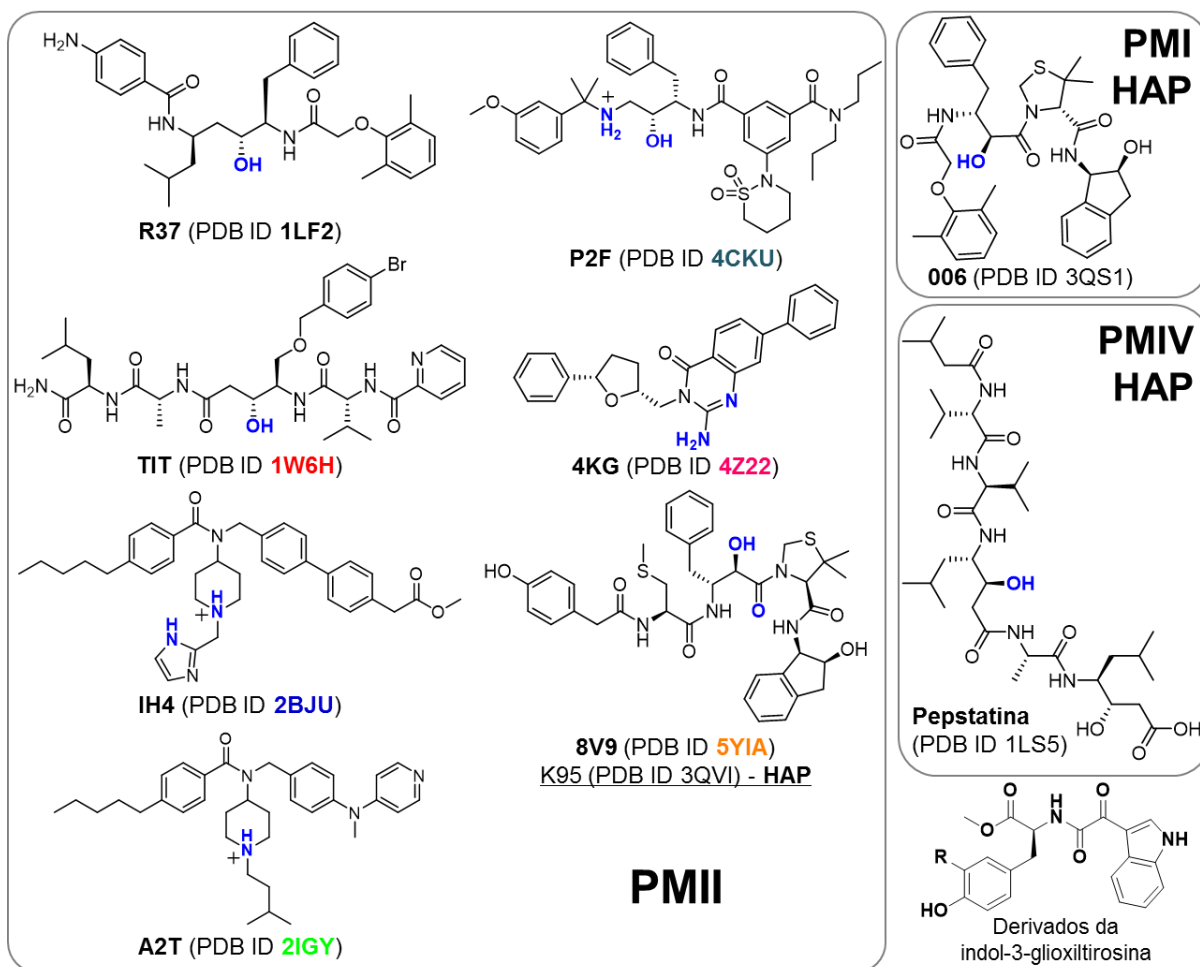
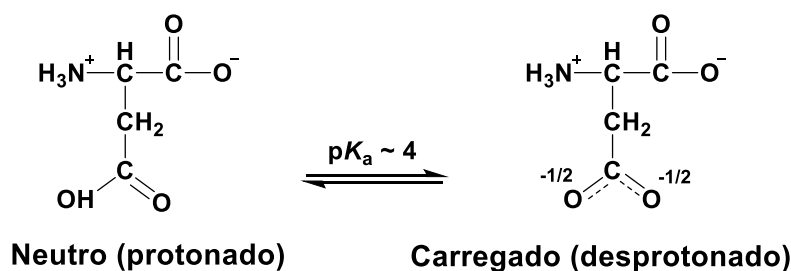


FIGURA 4.15 – Estruturas dos inibidores cristalográficos presentes nas estruturas avaliadas das plasmepsinas vacuolares de *P. falciparum*.  
Fonte: Elaborada pela autora.

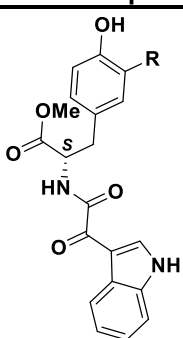
No caso das enzimas PMI, PMII e PMIV o resíduo Asp36 considerou-se desprotonado enquanto que, o Asp216 protonado (Esquema 4.4) (FRIEDMAN; CAFLISCH, 2007). No caso da HAP, consideraram-se as diversas combinações possíveis dos estados de protonação da díade catalítica, tomando a His36 como HSP e HSE (Esquema 4.2, após análises de contatos nas estruturas cristalográficas como o realizado na avaliação da enzima DHODH) e a Asp216 tanto neutra como desprotonada.



ESQUEMA 4.4 – Possíveis estados de protonação do aminoácido ácido *L*-aspártico a valores de pH próximos a 4.  
Fonte: Elaborada pela autora.

Os resultados das simulações de *docking* obtidos na estrutura da PMII com PDB ID 5YIA, em que o *flap* está em conformação semi-aberta, sobressaíram e foram selecionados para análises, sendo os valores de pontuação obtidos os apresentados na Tabela 4.12.

TABELA 4.12 – Valores de pontuação associados às poses selecionadas para análise dos compostos após simulações de *docking* na estrutura da PMII com PDB ID 5YIA.

Composto	-R	Pontuação ChemPLP	
	<b>6a</b>	Ph	82,8
	<b>6b</b>	4-F-Ph	82,9
	<b>6c</b>	4-Cl-Ph	83,3
	<b>6d</b>	4-Br-Ph	82,1
	<b>6e</b>	$\alpha$ -Metiltiofeno	78,5
	<b>6f</b>	Tiofeno	77,5
	<b>6h</b>	4-C(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> -Ph	85,6
	<b>6i</b>	3-OH-Ph	82,5
	<b>6j</b>	Naftil	87,9
	<b>6k</b>	4-COCH <sub>3</sub> -Ph	84,4
	<b>6l</b>	4-CF <sub>3</sub> -Ph	82,2
<b>8V9<sup>†</sup></b>		114,7	

<sup>†</sup> Resultados das simulações de *redocking*. As mesmas validam o experimento *in silico*.  
Fonte: elaborada pela autora.

No modo de ligação predito na estrutura da PMII com PDB ID 5YIA, o grupo indol foi posicionado no subsítio S1/S3 e os grupos –R, os quais ficaram expostos ao solvente e não apresentaram interações diferenciais, no subsítio S2' (Fig. 4.16-A). Observou-se uma ligação de hidrogênio entre o grupo fenil dos compostos e o resíduo Asp216 da díade catalítica, crucial para a inibição da enzima (Fig. 4.20-B, exceto pelos compostos **6i**, **6j**, **6k** e **6l**). As interações comuns observadas, representadas para o composto **6a** na Fig. 4.16-B, são:

- Ligação de hidrogênio entre o átomo de oxigênio da função cetona dos ligantes ligada ao –NH<sub>amida</sub> e a cadeia lateral do resíduo Ser81 localizado no subsítio 1/subsítio 3.
- Ligação de hidrogênio entre o ceto-oxigênio da porção éster dos ligantes e a cadeia lateral do resíduo Ser81 localizado no subsítio 1/subsítio 3.
- Ligação de hidrogênio entre o grupo –NH<sub>amida</sub> dos ligantes e o átomo de oxigênio da cadeia principal do resíduo Gly218 localizado no subsítio 1/subsítio 3.
- Interação -CH $\cdots\pi$  entre o grupo indol dos ligantes e a cadeia lateral da Thr219 localizado no subsítio 1/subsítio 3.

- Ligação de hidrogênio entre o átomo de oxigênio da porção oxoacetamida vizinho ao grupo indol e a cadeia principal do resíduo Ser220 localizado no subsítio 1/subsítio 3.
- Interação  $\pi$  na forma T entre os grupos  $-R$  e a cadeia lateral do resíduo Tyr79 localizado no subsítio S2'.
- Interações do tipo van der Waals com os resíduos Ile34 (subsítio 1/subsítio 3), Asp36 (díade catalítica), Gly38, Ser39 (subsítio 2'), Val80 (subsítio 1'), Phe113 (*flap*), Thr116 (subsítio 1/subsítio 3), Phe122 (subsítio 1), Ala221 (subsítio 2), Thr223 (subsítio 2), Ile292 (subsítio 2), Le294 (subsítio 1') e Ile302 (subsítio 2) foram também observadas.

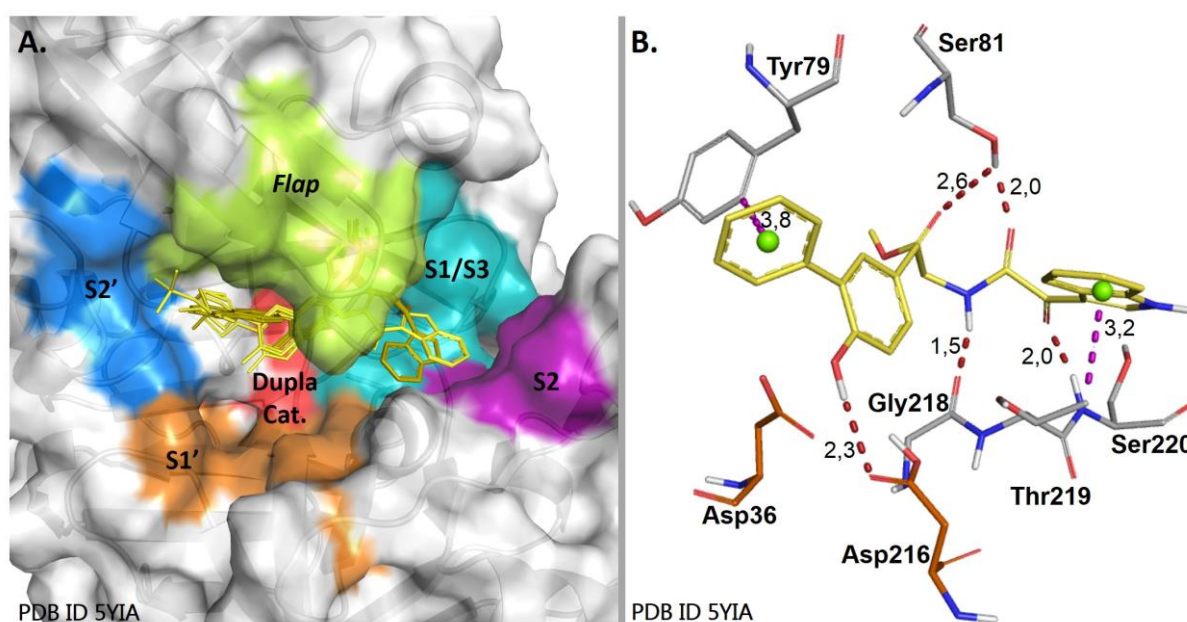


FIGURA 4.16 – Modo de ligação predito para os compostos após simulações de *docking* na estrutura da PMII de *P. falciparum* com PDB ID 5YIA (A.) e interações comuns observadas nos complexos obtidos representadas para o composto **6a**, apresentado em amarelo (B.). A díade catalítica é apresentada na cor vermelhão. Comprimentos em Å. As ligações de hidrogênio, são apresentadas em vermelho em quanto que as interações- $\pi$ , em roxo. Para maior clareza, unicamente os hidrogênios polares são representados.

Fonte: elaborada pela autora.

A estabilidade do complexo PMII-**6a** foi avaliada empregando simulações de DM. No total, foram geradas três trajetórias independentes, nas que não foram observadas mudanças estruturais na enzima, como apresentado pela evolução temporal do Rg e do RMSD dos carbonos- $\alpha$ , frente as suas posições iniciais (Fig. 4.17-A). Durante o tempo simulado, o *flap* permaneceu na conformação semi-aberta (Fig. 4.17-B).

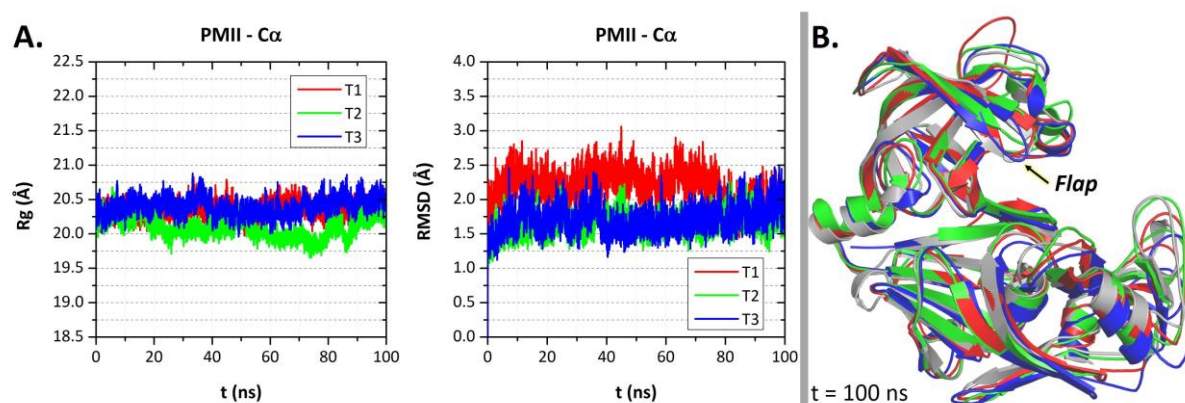


FIGURA 4.17 – Evolução temporal de algumas das características estruturais da PMII nas simulações de DM dos complexos PMII-**6a**. **A.** Evolução temporal do raio de giro e do RMSD dos carbonos- $\alpha$  da PMII. **B.** Sobreposição das estruturas da PMII correspondentes a  $t = 100$  ns. Na cor cinza é apresentada a estrutura cristalográfica de partida (PDB ID 5YIA). Cada cor corresponde a uma trajetória diferente. Fonte: elaborada pela autora.

Ao avaliar a dinâmica de **6a**, observou-se que o mesmo tendeu a adotar uma conformação em U (Fig. 4.18-D). Nas três trajetórias, apresentou um modo de ligação predominante em torno a valores de  $\text{RMSD}_{lig}$  de 2 Å, valor calculado com respeito à posição dos átomos não-hidrogênios de **6a** no modo de ligação predito nas simulações de *docking* (Fig. 4.18-B). As análises das ligações de hidrogênio mostraram que, no meio aquoso, a interação entre o grupo  $-\text{OH}_{\text{fenol-6a}}$  e a díade catalítica é predominante com o resíduo Asp36. A frequência registrada para as ligações de hidrogênio com a díade catalítica é de  $93\% \pm 5\%$  e  $22\% \pm 14\%$ , considerando os resíduos Asp36 e Asp216 respectivamente e de  $21\% \pm 11\%$  considerando a díade catalítica de forma simultânea (Tabela 4.13).

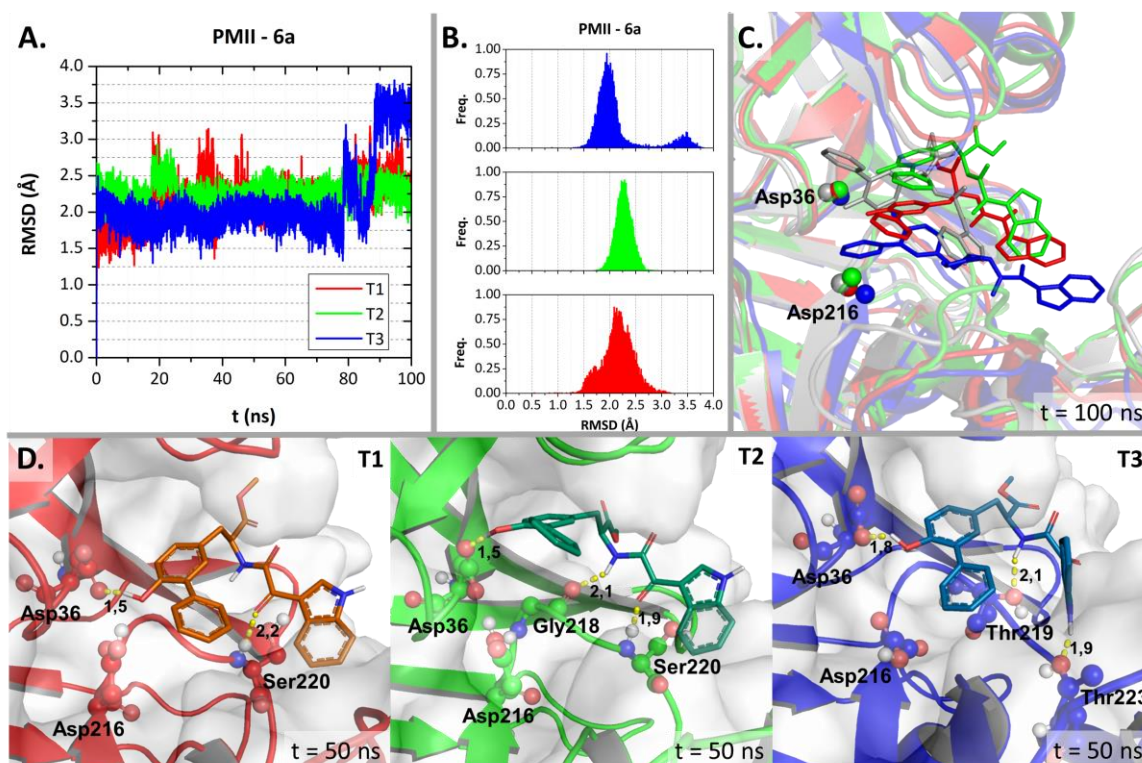


FIGURA 4.18 – Evolução temporal do composto **6a** nas simulações de DM dos complexos PMII-**6a**. **A.** Evolução temporal do RMSD dos átomos não-hidrogênios do composto **6a**. Referência: Posições iniciais dos átomos não-hidrogênios. **B.** Distribuições normalizadas dos valores de RMSD apresentados em **A.** **C.** Sobreposição das estruturas do complexo PMII-**6a** a  $t = 100$  ns. Com esferas, destacam-se as posições da díade catalítica. O composto **6a** é apresentado como paus. Na cor cinza é apresentada a pose predita no *docking*. **D.** Conformações observadas para o composto **6a** no sítio de ligação da PMII no  $t = 50$  ns de cada trajetória. Para cada, são mostrados os resíduos da díade catalítica e aqueles com os que o composto se encontra interagindo via ligações de hidrogênio. Distancias em Å. Cada cor corresponde a uma trajetória diferente. Fonte: elaborada pela autora.

TABELA 4.13 – Ocupação no tempo (%) das ligações de hidrogênio entre a enzima PMII e o composto **6a** estabelecidas durante as simulações de DM. Em parênteses é apresentado o desvio padrão.

Resíduo Participante		Caráter	T1	T2	T3	Média (DP)
Asp36	Cadeia lateral	Aceptor	97	95	87	93 (5)
Asp216	Cadeia lateral	Aceptor e doador	33	6	27	22 (14)
Asp36 & Asp216	Cadeia Lateral	Aceptor e doador	32	6	25	21 (11)
Ser81	Cadeia lateral	Doador	8	12	1	7 (6)
Gly218 <sup>a</sup>	Cadeia principal	Aceptor	2	42	4	16 (23)
Thr219	Cadeia lateral	Aceptor	10	2	68	27 (36)
Ser220 <sup>b</sup>	Cadeia principal	Doador	58	88	16	54 (36)

<sup>a</sup>Envolvendo o átomo de O da cadeia principal. <sup>b</sup>Envolvendo o átomo de N da cadeia principal.

Fonte: elaborada pela autora.

Na terceira trajetória gerada, observou-se a perda da ligação de hidrogênio a díade catalítica e o processo de desligue (*unbinding*) em tempos em torno aos 90 ns (Fig. 4.18-A, B). Ao monitorar as demais ligações de hidrogênio preditas no *docking*, observou-se que aquela com os resíduos Ser81 (cadeia lateral) e Gly218 (cadeia principal) apresentaram uma ocupação no tempo menor ao 20% (Tabela

4.13). Já o predito com o átomo de nitrogênio da cadeia principal do resíduo Ser220, apresentou uma ocupação no tempo de  $54\% \pm 36\%$ . A única ligação de hidrogênio não predita nas simulações de *docking* e observada durante as simulações de DM com uma frequência superior ao 10% foi aquela com a cadeia lateral da Thr219 (Tabela 4.14). Ao monitorar o número de ligações de hidrogênio estabelecidas de forma simultânea, observou-se que a tendência é a de manter 2 ou 3 HB simultâneos PMII-**6a** (Tabela 4.14).

TABELA 4.14 – Ocupação no tempo (%) das ligações de hidrogênio simultâneas entre a enzima PMII e o composto **6a** estabelecidas durante as simulações de DM. Em parênteses é apresentado o desvio padrão.

n. de HB simultâneos	T1	T2	T3	Média (DP)
0	1	1	2	1 (0)
1	21	9	9	13 (6)
2	42	33	15	30 (11)
3	31	44	49	41 (8)
4	5	10	22	12 (7)
5	0	2	2	1 (1)

Fonte: elaborada pela autora.

Assim, as simulações de DM mostram que os compostos, na presença de solvente explícito, seriam capazes de inibir a enzima PMII, ligando-se a mesma numa conformação preferencial em U. Os derivados de indol-3-glioxiltirosina seriam capazes de interagir com a díade catalítica mediante ligações de hidrogênio, bloqueando o sítio catalítico. Como no caso da enzima DHODH, a diferença na capacidade inibitória ao longo da série seria consequência das diferenças na distribuição eletrônica dos compostos, o que permitiria fortalecer as interações do tipo ligação de hidrogênio estabelecidas pelo grupo  $-\text{NH}_{\text{amida}}$  (envolvendo os resíduos Gly218 e Thr219) nos compostos mais ativos da série (**6b** e **6d**), assim como por grupos  $-\text{R}$  com valores mais favoráveis de  $\Delta G_{\text{Hidratação}}$  (Tabela 4.6).



## CAPÍTULO 5 – CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Os compostos derivados de indol-3-glioxiltirosina com atividade antimalárica *in vitro*, frente ao estágio intra-eritrocítico do *Plasmodium falciparum*, reportados por Vasconcelos e colaboradores, foram modelados de forma satisfatória empregando como referência o confórmero tridimensional da (2-(1H-indol-3-il)-2-oxoacetil)-L-tirosina disponível na base de dados PubChem. Com estes, foram realizadas simulações de *docking* em 34 enzimas diferentes do *Plasmodium falciparum*, com estruturas disponíveis no Banco de Dados de Proteínas, as quais estão presentes/são essenciais durante o estágio intra-eritrocítico da infecção.

Os resultados das simulações de *docking* molecular nas enzimas dihidroorotato desidrogenase (DHODH) e plasmepsina II (PMII) sobressaíram após análise detalhada dos mesmos. Levou-se em consideração i) o reconhecimento de padrões de ligação, ii) os valores de pontuação e iii) a informação disponível na literatura assim como o conhecimento extraído das análises dos complexos proteína-ligante cristalográficos para determinar se os modos de ligação preditos conseguiriam estabelecer as interações não-covalentes fundamentais para a inibição dos alvos.

No modo de ligação predito pelas simulações de *docking* na enzima DHODH, o *scaffold* comum dos compostos estabelece as interações fundamentais para a inibição da enzima, quer dizer as ligações de hidrogênio envolvendo as cadeias laterais dos resíduos His185 (observada nos resultados de *docking* quando considerado este resíduo no estado biprotonado) e Arg265, junto com uma interação- $\pi$  envolvendo a cadeia lateral do resíduo Phe227. Os grupos -R dos compostos mais ativos (4-F-Ph e 4-Br-Ph para **6b** e **6d** respectivamente) seriam os responsáveis pela melhor atividade antiplasmodial ao interagir de forma favorável com o solvente, ao que ficam expostos. O monitoramento da estabilidade no tempo das interações do tipo ligação de hidrogênio proteína-ligante, cruciais para a inibição deste alvo, suporta os valores de atividade antiplasmodial na casa micromolar registradas pelos compostos. Os dados disponíveis na literatura indicam que, em ensaios *in vitro* contra o estágio intra-eritrocítico de *Pf*, inibidores que não interagem via ligação de hidrogênio com a cadeia lateral da His185, apresentam baixa atividade antiparasitária (na faixa mili- a micromolar) enquanto que, inibidores que interagem fortemente mediante ligações de hidrogênio com as cadeias laterais dos resíduos His185 e Arg265 apresentam alta atividade antimalárica (na faixa nanomolar).



No modo de ligação predito pelas simulações de *docking* na enzima PMII, as interações fundamentais para a inibição da enzima, quer dizer, interações do tipo ligação de hidrogênio com a cadeia lateral dos resíduos constituintes da díade catalítica (Asp36 e Asp216), é satisfeito pela função hidroxila presente no *scaffold* comum dos compostos. Os diferentes grupos –R estão expostos ao solvente, sendo que os mesmos influenciariam na atividade antiplasmodial dos compostos da mesma forma que na DHODH. O monitoramento da estabilidade do complexo PMII-6a empregando simulações de dinâmica molecular mostrou que, na presença de solvente explícito, os compostos prefeririam adotar uma conformação em U, e que a ligação de hidrogênio com a díade catalítica seria estável e preferencial com o resíduo Asp36. O caso da enzima PMII é diferente do da DHODH já que para atingir valores de atividade antiplasmodial na casa nanomolar ou menor é necessário inibir simultaneamente uma outra plasmepsina vacuolar.

Assim, baseando-nos na concordância dos valores de atividade antiplasmodial exibidos pelos e os resultados das simulações de *docking* e dinâmica molecular, identificaram-se as enzimas de *Plasmodium falciparum* dihidroorotato desidrogenase (DHODH) e plasmepsina II (PMII) como sendo os alvos viáveis dos compostos.

A partir dos resultados aqui apresentados, trabalhos futuros podem ser desenvolvidos visando a otimização dos derivados de indol-3-glioxiltirosina, empregando uma estratégia baseada na estrutura do receptor (*structure-based drug design*). No caso da DHODHPf, sugere-se explorar o uso de grupos substituintes de fórmula  $-(CH_2)_n-(4-X-Ph)$ , com X = F, Cl e Br. Em adição, considera-se necessário a integração de métodos mais sofisticados para estimar a energia livre de ligação dos compostos aos receptores, tais como simulações FEP (*Free Energy Perturbation*).

## CAPÍTULO 6 – REFERÊNCIAS

ABRAHAM, M. J. et al. GROMACS: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers. **SoftwareX**, v. 1–2, p. 19–25, set. 2015.

ALBRECHT, W. et al. Prediction of human drug-induced liver injury (DILI) in relation to oral doses and blood concentrations. **Archives of Toxicology**, v. 93, n. 6, p. 1609–1637, 27 jun. 2019.

ALLEN, M. P. Introduction to Molecular Dynamics Simulation. In: ATTIG, N. et al. (Eds.). . **Computational Soft Matter: From Synthetic Polymers to Proteins, Lecture Notes**. Jülich: John von Neumann Institute for Computing (NIC), 2004. v. 23p. 1–28.

ALTSCHUL, S. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, v. 25, n. 17, p. 3389–3402, 1 set. 1997.

ALTSCHUL, S. F. et al. Protein database searches using compositionally adjusted substitution matrices. **FEBS Journal**, v. 272, n. 20, p. 5101–5109, out. 2005.

ASOJO, O. A. et al. Structures of Ser205 mutant plasmepsin II from *Plasmodium falciparum* at 1.8 Å in complex with the inhibitors rs367 and rs370. **Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography**, v. 58, n. 12, p. 2001–2008, 1 dez. 2002.

ASOJO, O. A. et al. Novel uncomplexed and complexed structures of plasmepsin II, an aspartic protease from *Plasmodium falciparum*. **Journal of Molecular Biology**, v. 327, n. 1, p. 173–181, 2003.

ATHANASIOU, C.; COURNIA, Z. From Computers to Bedside: Computational Chemistry Contributing to FDA Approval. In: GERVASIO, F. L.; SPIWOK, V. (Eds.). . **Biomolecular Simulations in Structure-Based Drug Discovery**. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co., 2018. p. 163–203.

BANSAL, A. et al. *Plasmodium falciparum* Calcium-Dependent Protein Kinase 2 Is Critical for Male Gametocyte Exflagellation but Not Essential for Asexual Proliferation. **mBio**, v. 8, n. 5, 8 nov. 2017.

BERENDSEN, H. J. C. et al. Molecular dynamics with coupling to an external bath. **The Journal of Chemical Physics**, v. 81, n. 8, p. 3684–3690, 15 out. 1984.

BERENDSEN, H. J. C.; VAN DER SPOEL, D.; VAN DRUNEN, R. GROMACS: A message-passing parallel molecular dynamics implementation. **Computer Physics Communications**, v. 91, n. 1–3, p. 43–56, set. 1995.

BERMAN, H. M. et al. The Protein Data Bank. **Nucleic Acids Research**, v. 28, n. 1, p. 235–242, 1 jan. 2000.

BEST, R. B. et al. Optimization of the Additive CHARMM All-Atom Protein Force Field Targeting Improved Sampling of the Backbone  $\phi$ ,  $\psi$  and Side-Chain  $\chi_1$  and  $\chi_2$

Dihedral Angles. **Journal of Chemical Theory and Computation**, v. 8, n. 9, p. 3257–3273, 11 set. 2012.

BHATT, T. K. et al. Ligand-bound Structures Provide Atomic Snapshots for the Catalytic Mechanism of d-Amino Acid Deacylase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 8, p. 5917–5930, 19 fev. 2010.

BHAUMIK, P. et al. Crystal Structures of the Histo-Aspartic Protease (HAP) from *Plasmodium falciparum*. **Journal of Molecular Biology**, v. 388, n. 3, p. 520–540, 2009.

BHAUMIK, P. et al. Crystal structures of the free and inhibited forms of plasmepsin I (PMI) from *Plasmodium falciparum*. **Journal of Structural Biology**, v. 175, n. 1, p. 73–84, jul. 2011a.

BHAUMIK, P. et al. Structural Insights into the Activation and Inhibition of Histo-Aspartic Protease from *Plasmodium falciparum*. **Biochemistry**, v. 50, n. 41, p. 8862–8879, 18 out. 2011b.

BINDER, K. et al. Molecular dynamics simulations. **Journal of Physics: Condensed Matter**, v. 16, n. 5, p. S429–S453, 11 fev. 2004.

BIOINFORMATICS, S. I. OF. **Click2Drug**. Disponível em: <<https://www.click2drug.org/index.html#Docking>>. Acesso em: 25 out. 2019.

BIOVIA, D. S. **Discovery Studio Visualizer**. San Diego Dassault Systèmes, 2016.

BIRKHOLTZ, L.-M. et al. Sustainable malaria control: transdisciplinary approaches for translational applications. **Malaria Journal**, v. 11, n. 1, p. 431, 2012.

BLASCO, B.; LEROY, DI.; FIDOCK, D. A. Antimalarial drug resistance: linking *Plasmodium falciparum* parasite biology to the clinic. **Nature Medicine**, v. 23, n. 8, p. 917–928, 4 ago. 2017.

BOFILL, L. et al. Hydrogen Bond Polarization Overcomes Unfavorable Packing in the Most Stable High Z' Polymorph of Pterostilbene. **Crystal Growth & Design**, v. 19, n. 5, p. 2552–2556, maio 2019.

BONDI, A. Van der Waals volumes and radii. **The Journal of Physical Chemistry**, v. 68, n. 3, p. 441–451, mar. 1964.

BOOKER, M. L. et al. Novel inhibitors of *Plasmodium falciparum* dihydroorotate dehydrogenase with anti-malarial activity in the mouse model. **The Journal of biological chemistry**, v. 285, n. 43, p. 33054–64, 22 out. 2010.

BOSS, C. et al. Achiral, Cheap, and Potent Inhibitors of Plasmepsins I, II, and IV. **ChemMedChem**, v. 1, n. 12, p. 1341–1345, 11 dez. 2006.

BRACCHI-RICARD, V. et al. Characterization of an Eukaryotic Peptide Deformylase from *Plasmodium falciparum*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 396, n. 2, p. 162–170, dez. 2001.

BYJU'S. **Malaria**. Disponível em: <<https://byjus.com/biology/common-diseases-in-humans-malaria/>>. Acesso em: 11 abr. 2020.

CASSERA, M. B. et al. Purine and pyrimidine pathways as targets in *Plasmodium falciparum*. **Current topics in medicinal chemistry**, v. 11, n. 16, p. 2103–15, 2011.

CAVALLO, G. et al. The Halogen Bond. **Chemical Reviews**, v. 116, n. 4, p. 2478–2601, 24 fev. 2016.

COOMBS, G. H. et al. Aspartic proteases of *Plasmodium falciparum* and other parasitic protozoa as drug targets. **Trends in Parasitology**, v. 17, n. 11, p. 532–537, nov. 2001.

CCDC SOFTWARE. **GOLD User Guide**. Cambridge: CCDC, 2018.

CHIBA, P. et al. The SYBR Green I Malaria Drug Sensitivity Assay: Performance in Low Parasitemia Samples. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 82, n. 3, p. 398–401, 1 mar. 2010.

CLARK, T.; MURRAY, J. S.; POLITZER, P. A perspective on quantum mechanics and chemical concepts in describing noncovalent interactions. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 20, n. 48, p. 30076–30082, 2018.

COCKCROFT, J. K. et al. The temperature dependence of C-H...F-C interactions in benzene:hexafluorobenzene. **CrystEngComm**, v. 20, n. 42, p. 6677–6682, 2018.

COLE, J. C. et al. Comparing protein-ligand docking programs is difficult. **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics**, v. 60, n. 3, p. 325–332, 3 jun. 2005.

COLLINS, W. E. *Plasmodium knowlesi*: A Malaria Parasite of Monkeys and Humans. **Annual Review of Entomology**, v. 57, n. 1, p. 107–121, 7 jan. 2012.

CONTRERAS-GARCÍA, J. et al. NCILOT: A Program for Plotting Noncovalent Interaction Regions. **Journal of Chemical Theory and Computation**, v. 7, n. 3, p. 625–632, 8 mar. 2011.

COTERON, J. M. et al. Structure-Guided Lead Optimization of Triazolopyrimidine-Ring Substituents Identifies Potent *Plasmodium falciparum* Dihydroorotate Dehydrogenase Inhibitors with Clinical Candidate Potential. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 54, n. 15, p. 5540–5561, 11 ago. 2011.

CUI, L. et al. PfGCN5-Mediated Histone H3 Acetylation Plays a Key Role in Gene Expression in *Plasmodium falciparum*. **Eukaryotic Cell**, v. 6, n. 7, p. 1219–1227, jul. 2007.

DARDEN, T.; YORK, D.; PEDERSEN, L. Particle mesh Ewald: An  $N \cdot \log(N)$  method for Ewald sums in large systems. **The Journal of Chemical Physics**, v. 98, n. 12, p. 10089–10092, 15 jun. 1993.

DE VIVO, M. et al. Role of Molecular Dynamics and Related Methods in Drug Discovery. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 59, n. 9, p. 4035–4061, 12 maio 2016.

DELANO, W. L. The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.8. **Schrödinger LLC**, p. <http://www.pymol.org>, 2014.

DENG, X. et al. Discovery of novel 1H-imidazol-2-yl-pyrimidine-4,6-diamines as potential antimalarials. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 20, n. 14, p. 4027–4031, jul. 2010.

DENG, X. et al. Structural Plasticity of Malaria Dihydroorotate Dehydrogenase Allows Selective Binding of Diverse Chemical Scaffolds. **Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 39, p. 26999–27009, 25 set. 2009.

DENG, X. et al. Fluorine Modulates Species Selectivity in the Triazolopyrimidine Class of Plasmodium falciparum Dihydroorotate Dehydrogenase Inhibitors. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 57, n. 12, p. 5381–5394, 26 jun. 2014.

DENG, X. et al. The X-ray structure of Plasmodium falciparum dihydroorotate dehydrogenase bound to a potent and selective N -phenylbenzamide inhibitor reveals novel binding-site interactions. **Acta Crystallographica Section F Structural Biology Communications**, v. 71, n. 5, p. 553–559, 1 maio 2015.

DHANGADAMAJHI, G.; KAR, S. K.; RANJIT, M. The Survival Strategies of Malaria Parasite in the Red Blood Cell and Host Cell Polymorphisms. **Malaria Research and Treatment**, v. 2010, p. 1–9, 2010.

DITTRICH, S. et al. An atypical orthologue of 6-pyruvoyltetrahydropterin synthase can provide the missing link in the folate biosynthesis pathway of malaria parasites. **Molecular Microbiology**, v. 67, n. 3, p. 609–618, fev. 2008.

DOWLING, D. P. et al. Crystal Structure of Arginase from Plasmodium falciparum and Implications for L -Arginine Depletion in Malarial Infection,. **Biochemistry**, v. 49, n. 26, p. 5600–5608, 6 jul. 2010.

DU, X. et al. Insights into Protein–Ligand Interactions: Mechanisms, Models, and Methods. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 2, p. 144, 26 jan. 2016.

ERMONDI, G.; CARON, G. Recognition forces in ligand-protein complexes: Blending information from different sources. **Biochemical Pharmacology**, v. 72, n. 12, p. 1633–1645, 2006.

ERSMARK, K.; SAMUELSSON, B.; HALLBERG, A. Plasmepsins as potential targets for new antimalarial therapy. **Medicinal Research Reviews**, v. 26, n. 5, p. 626–666, set. 2006.

FAN, J.; FU, A.; ZHANG, L. Progress in molecular docking. **Quantitative Biology**, v. 7, n. 2, p. 83–89, 4 jun. 2019.

FRIEDMAN, R.; CAFLISCH, A. The protonation state of the catalytic aspartates in plasmepsin II. **FEBS Letters**, v. 581, n. 21, p. 4120–4124, 21 ago. 2007.

FRIEDMAN, R.; CAFLISCH, A. Discovery of plasmepsin inhibitors by fragment-based docking and consensus scoring. **ChemMedChem**, v. 4, n. 8, p. 1317–1326, 2009.

FRIEDRICH, N.; SIMSIR, M.; KIRCHMAIR, J. How Diverse Are the Protein-Bound Conformations of Small-Molecule Drugs and Cofactors? **Frontiers in Chemistry**, v. 6, n. March, p. 1–16, 27 mar. 2018.

FU, C.-F.; TIAN, S. X. Different aggregation dynamics of benzene–water mixtures. **Phys. Chem. Chem. Phys.**, v. 16, n. 40, p. 21957–21963, 2014.

FULTON, B. S. **Drug Discovery for the Treatment of Addiction**. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2014.

GENOME RESEARCH LIMITED. **How are drugs designed and developed?** Disponível em: <<https://www.yourgenome.org/facts/how-are-drugs-designed-and-developed>>. Acesso em: 11 abr. 2020.

GINSBURG, H.; ABDEL-HALEEM, A. M. Malaria Parasite Metabolic Pathways (MPMP) Upgraded with Targeted Chemical Compounds. **Trends in Parasitology**, v. 32, n. 1, p. 7–9, jan. 2016.

HAIN, A. U. P. et al. Identification of an Atg8-Atg3 Protein–Protein Interaction Inhibitor from the Medicines for Malaria Venture Malaria Box Active in Blood and Liver Stage Plasmodium falciparum Parasites. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 57, n. 11, p. 4521–4531, 12 jun. 2014.

HESS, B. et al. LINCS: A linear constraint solver for molecular simulations. **Journal of Computational Chemistry**, v. 18, n. 12, p. 1463–1472, set. 1997.

HO, P. S. Biomolecular Halogen Bonds. In: METRANGOLO, P.; RESNATI, G. (Eds.). **Halogen Bonding I**. [s.l.] Springer International Publishing, 2014. p. 241–276.

HOQUE, I. et al. An Approach of Computer-Aided Drug Design (CADD) Tools for In Silico Pharmaceutical Drug Design and Development. **International Journal of Advanced Research in Biological Sciences (IJARBS)**, v. 4, n. 2, p. 60–71, 10 fev. 2017.

HOUNKPATIN, A. B.; KREIDENWEISS, A.; HELD, J. Clinical utility of tafenoquine in the prevention of relapse of Plasmodium vivax malaria: a review on the mode of action and emerging trial data. **Infection and Drug Resistance**, v. Volume 12, p. 553–570, mar. 2019.

HR HEALTHCARE LTD. **Our Malaria World Map of Estimated Risk (2018 update)**. Disponível em: <<https://www.treated.com/malaria/world-map-risk>>. Acesso em: 11 abr. 2020.

HUANG, J. et al. CHARMM36m: an improved force field for folded and intrinsically disordered proteins. **Nature Methods**, v. 14, n. 1, p. 71–73, 7 jan. 2017.

HUIZING, A. P.; MONDAL, M.; HIRSCH, A. K. H. Fighting Malaria: Structure-Guided Discovery of Nonpeptidomimetic Plasmepsin Inhibitors. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 58, n. 13, p. 5151–5163, 9 jul. 2015.

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

HURT, D. E.; WIDOM, J.; CLARDY, J. Structure of Plasmodium falciparum dihydroorotate dehydrogenase with a bound inhibitor. **Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography**, v. 62, n. 3, p. 312–323, 1 mar. 2006.

ISRAELACHVILI, J. N. **Intermolecular and Surface Forces**. 3. ed. [s.l.] Elsevier, 2011.

JAIN, V. et al. Targeting Prolyl-tRNA Synthetase to Accelerate Drug Discovery against Malaria, Leishmaniasis, Toxoplasmosis, Cryptosporidiosis, and Coccidiosis. **Structure**, v. 25, n. 10, p. 1495- 1505.e6, out. 2017.

JAUDZEMS, K. et al. Plasmepsin Inhibitory Activity and Structure-Guided Optimization of a Potent Hydroxyethylamine-Based Antimalarial Hit. **ACS Medicinal Chemistry Letters**, v. 5, n. 4, p. 373–377, 10 abr. 2014.

JOHANSSON, P.-O. et al. Design and Synthesis of Potent Inhibitors of Plasmepsin I and II: X-ray Crystal Structure of Inhibitor in Complex with Plasmepsin II. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 48, n. 13, p. 4400–4409, jun. 2005.

JOHNSON, E. R. et al. Revealing Noncovalent Interactions. **Journal of the American Chemical Society**, v. 132, n. 18, p. 6498–6506, 12 maio 2010.

JONES, G. et al. Development and validation of a genetic algorithm for flexible docking. **Journal of Molecular Biology**, v. 267, n. 3, p. 727–748, abr. 1997.

JONES, G.; WILLETT, P.; GLEN, R. C. Molecular recognition of receptor sites using a genetic algorithm with a description of desolvation. **Journal of Molecular Biology**, v. 245, n. 1, p. 43–53, jan. 1995.

JORGENSEN, W. L. et al. Comparison of simple potential functions for simulating liquid water. **The Journal of Chemical Physics**, v. 79, n. 2, p. 926–935, 15 jul. 1983.

KABSCH, W.; SANDER, C. Dictionary of protein secondary structure: Pattern recognition of hydrogen-bonded and geometrical features. **Biopolymers**, v. 22, n. 12, p. 2577–2637, dez. 1983.

KE, H. et al. Mitochondrial type II NADH dehydrogenase of Plasmodium falciparum (PfNDH2) is dispensable in the asexual blood stages. **PloS one**, v. 14, n. 4, p. e0214023, 2019.

KELLENBERGER, E. et al. Comparative evaluation of eight docking tools for docking and virtual screening accuracy. **Proteins**, v. 57, n. 2, p. 225–42, 1 nov. 2004.

KIM, S. et al. PubChem 2019 update: improved access to chemical data. **Nucleic Acids Research**, v. 47, n. D1, p. D1102–D1109, 8 jan. 2019.

KOKKONDA, S. et al. Tetrahydro-2-naphthyl and 2-Indanyl Triazolopyrimidines Targeting Plasmodium falciparum Dihydroorotate Dehydrogenase Display Potent and Selective Antimalarial Activity. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 59, n. 11, p. 5416–5431, 2016.

KOKKONDA, S. et al. Isoxazolopyrimidine-Based Inhibitors of Plasmodium falciparum Dihydroorotate Dehydrogenase with Antimalarial Activity. **ACS Omega**, v. 3, n. 8, p. 9227–9240, 2018.

KORB, O.; STÜTZLE, T.; EXNER, T. E. Empirical Scoring Functions for Advanced Protein–Ligand Docking with PLANTS. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 49, n. 1, p. 84–96, 26 jan. 2009.

KRUNGKRAI, J. Purification, characterization and localization of mitochondrial dihydroorotate dehydrogenase in Plasmodium falciparum, human malaria parasite. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, v. 1243, n. 3, p. 351–360, abr. 1995.

LALLOO, D. G. et al. UK malaria treatment guidelines 2016. **Journal of Infection**, v. 72, n. 6, p. 635–649, jun. 2016.

LANG-UNNASCH, N.; MURPHY, A. D. Metabolic changes of the malaria parasite during the transition from the human to the mosquito host. **Annual Review of Microbiology**, v. 52, n. 1, p. 561–590, out. 1998.

LAURO, G. et al. Inverse Virtual Screening allows the discovery of the biological activity of natural compounds. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 20, n. 11, p. 3596–3602, 2012.

LEE, A.; LEE, K.; KIM, D. Using reverse docking for target identification and its applications for drug discovery. **Expert Opinion on Drug Discovery**, v. 11, n. 7, p. 707–715, 2 jul. 2016.

LEELANANDA, S. P.; LINDERT, S. Computational methods in drug discovery. p. 2694–2718, 2016.

LENGELER, C. Insecticide-treated bed nets and curtains for preventing malaria. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, n. 2, 19 abr. 2004.

LI, S.; HONG, M. Protonation, Tautomerization, and Rotameric Structure of Histidine: A Comprehensive Study by Magic-Angle-Spinning Solid-State NMR. **Journal of the American Chemical Society**, v. 133, n. 5, p. 1534–1544, 9 fev. 2011.

LIU, J.; ISTVAN, E. S.; GOLDBERG, D. E. Hemoglobin-degrading Plasmepsin II Is Active as a Monomer. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 50, p. 38682–38688, 15 dez. 2006.

LIU, K.; KOKUBO, H. Exploring the Stability of Ligand Binding Modes to Proteins by Molecular Dynamics Simulations: A Cross-docking Study. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 57, n. 10, p. 2514–2522, 23 out. 2017.

LORENZO, S.; LEWIS, G. R.; DANCE, I. Supramolecular potentials and embraces for fluorinated aromatic molecules. **New Journal of Chemistry**, v. 24, n. 5, p. 295–304, 2000.

LUNEV, S. et al. Crystal structure of truncated aspartate transcarbamoylase from Plasmodium falciparum. **Acta Crystallographica Section F Structural Biology Communications**, v. 72, n. 7, p. 523–533, 1 jul. 2016.



MAKENENI, S.; THIEKER, D. F.; WOODS, R. J. Applying Pose Clustering and MD Simulations To Eliminate False Positives in Molecular Docking. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 58, n. 3, p. 605–614, 26 mar. 2018.

MISHRA, V. et al. Deciphering the mechanism of potent peptidomimetic inhibitors targeting plasmepsins - biochemical and structural insights. **The FEBS Journal**, v. 285, n. 16, p. 3077–3096, ago. 2018.

MIYAMOTO, S.; KOLLMAN, P. A. Settle: An analytical version of the SHAKE and RATTLE algorithm for rigid water models. **Journal of Computational Chemistry**, v. 13, n. 8, p. 952–962, out. 1992.

MORAHAN, B. J.; WANG, L.; COPPEL, R. L. No TRAP, no invasion. **Trends in Parasitology**, v. 25, n. 2, p. 77–84, fev. 2009.

NASAMU, A. S. et al. Malaria parasite plasmepsins: More than just plain old degradative pepsins. **Journal of Biological Chemistry**, p. jbc.REV120.009309, 4 maio 2020.

MORRIS, G. M.; LIM-WILBY, M. Molecular Docking. In: KUKOL, A. (Ed.). . **Molecular Modeling of Proteins. Methods Molecular Biology**<sup>TM</sup>. Totowa, NJ: Humana Press, 2008. v. 443p. 365–382.

MUELLER, I.; ZIMMERMAN, P. A.; REEDER, J. C. Plasmodium malariae and Plasmodium ovale – the ‘bashful’ malaria parasites. **Trends in Parasitology**, v. 23, n. 6, p. 278–283, jun. 2007.

MURA, C.; MCANANY, C. E. An introduction to biomolecular simulations and docking. **Molecular Simulation**, v. 40, n. 10–11, p. 732–764, 9 ago. 2014.

MURRAY, J. S.; POLITZER, P. Molecular electrostatic potentials and noncovalent interactions. **WIREs Computational Molecular Science**, v. 7, n. 6, p. 1–10, 18 nov. 2017.

MURTHY, P. S. Molecular Handshake: Recognition through Weak Noncovalent Interactions. **Journal of Chemical Education**, v. 83, n. 7, p. 1010, jul. 2006.

NAMBA, A. M.; SILVA, V. B. DA; SILVA, C. H. T. P. DA. Dinâmica molecular: teoria e aplicações em planejamento de fármacos. **Eclética Química**, v. 33, n. 4, p. 13–24, dez. 2008.

PACE, C. J.; GAO, J. Exploring and exploiting polar- $\pi$  interactions with fluorinated aromatic amino acids. **Accounts of Chemical Research**, v. 46, n. 4, p. 907–915, 2013.

PAGADALA, N. S.; SYED, K.; TUSZYNSKI, J. Software for molecular docking: a review. **Biophysical Reviews**, v. 9, n. 2, p. 91–102, 2017.

PASAJE, C. F. A. et al. Selective inhibition of apicoplast tryptophanyl-tRNA synthetase causes delayed death in Plasmodium falciparum. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 27531, 9 jun. 2016.

PARRINELLO, M.; RAHMAN, A. Polymorphic transitions in single crystals: A new molecular dynamics method. **Journal of Applied Physics**, v. 52, n. 12, p. 7182–7190, dez. 1981.

PAUL, N. et al. Recovering the True Targets of Specific Ligands by Virtual Screening of the Protein Data Bank. **Proteins: Structure, Function and Genetics**, v. 54, n. 4, p. 671–680, 2004.

PHILLIPS, M. A. et al. A long-duration dihydroorotate dehydrogenase inhibitor (DSM265) for prevention and treatment of malaria. **Science Translational Medicine**, v. 7, n. 296, p. 296ra111-296ra111, 15 jul. 2015.

PHILLIPS, M. A. et al. A Triazolopyrimidine-Based Dihydroorotate Dehydrogenase Inhibitor with Improved Drug-like Properties for Treatment and Prevention of Malaria. **ACS Infectious Diseases**, v. 2, n. 12, p. 945–957, 9 dez. 2016.

PLOUFFE, D. et al. In silico activity profiling reveals the mechanism of action of antimalarials discovered in a high-throughput screen. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, n. 26, p. 9059–9064, 1 jul. 2008.

POLITZER, P.; MURRAY, J. An Overview of Strengths and Directionalities of Noncovalent Interactions:  $\sigma$ -Holes and  $\pi$ -Holes. **Crystals**, v. 9, n. 3, p. 165, 21 mar. 2019.

POLITZER, P.; MURRAY, J. S.  $\sigma$ -holes and  $\pi$ -holes: Similarities and differences. **Journal of Computational Chemistry**, v. 39, n. 9, p. 464–471, 2018.

PRADE, L. et al. X-ray Structure of Plasmepsin II Complexed with a Potent Achiral Inhibitor. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 25, p. 23837–23843, 24 jun. 2005.

PROUDFOOT, J. et al. Glossary of terms used in biomolecular screening (IUPAC Recommendations 2011). **Pure and Applied Chemistry**, v. 83, n. 5, p. 1129–1158, 7 fev. 2011.

RADOUX, C. J. et al. Identifying Interactions that Determine Fragment Binding at Protein Hotspots. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 59, n. 9, p. 4314–4325, 12 maio 2016.

RAJAN, S. et al. Small molecule Plasmodium FKBP35 inhibitor as a potential antimalaria agent. **Scientific Reports**, v. 3, n. 1, 2013.

RAMÍREZ, D.; CABALLERO, J. Is It Reliable to Take the Molecular Docking Top Scoring Position as the Best Solution without Considering Available Structural Data? **Molecules**, v. 23, n. 5, p. 1038, 28 abr. 2018.

RAMYA, T. N. C.; SUROLIA, N.; SUROLIA, A. Polyamine synthesis and salvage pathways in the malaria parasite Plasmodium falciparum. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 348, n. 2, p. 579–584, set. 2006.

RASINA, D. et al. Fragment-Based Discovery of 2-Aminoquinazolin-4(3H)-ones As Novel Class Nonpeptidomimetic Inhibitors of the Plasmepsins I, II, and IV. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 59, n. 1, p. 374–387, 14 jan. 2016.

RATHORE, I. et al. Activation mechanism of plasmepsins, pepsin-like aspartic proteases from Plasmodium, follows a unique trans-activation pathway. **The FEBS Journal**, p. febs.15363, 26 maio 2020.

RECACHA, R. et al. Structures of plasmepsin II from Plasmodium falciparum in complex with two hydroxyethylamine-based inhibitors. **Acta Crystallographica Section F Structural Biology Communications**, v. 71, n. 12, p. 1531–1539, 1 dez. 2015.

ROBERT, X.; GOUET, P. Deciphering key features in protein structures with the new ENDscript server. v. 42, n. April, p. 320–324, 2014.

ROSS, L. S. et al. In vitro resistance selections for Plasmodium falciparum dihydroorotate dehydrogenase inhibitors give mutants with multiple point mutations in the drug-binding site and altered growth. **The Journal of biological chemistry**, v. 289, n. 26, p. 17980–95, 27 jun. 2014.

RUIZ LOPEZ DEL PRADO, G. et al. Malaria in developing countries. **The Journal of Infection in Developing Countries**, v. 8, n. 01, 15 jan. 2014.

SAKANO, T. et al. Molecular dynamics analysis to evaluate docking pose prediction. **Biophysics and Physicobiology**, v. 13, p. 181–194, 2016.

SALMASO, V.; MORO, S. Bridging molecular docking to molecular dynamics in exploring ligand-protein recognition process: An overview. **Frontiers in Pharmacology**, v. 9, n. AUG, p. 1–16, 2018.

SANTOS, S. A. et al. Exploring the 3-piperidin-4-yl-1H-indole scaffold as a novel antimalarial chemotype. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 102, p. 320–333, set. 2015.

SCHOLFIELD, M. R. et al. Halogen bonding (X-bonding): A biological perspective. **Protein Science**, v. 22, n. 2, p. 139–152, fev. 2013.

SILVA, A. M. et al. Structure and inhibition of plasmepsin II, a hemoglobin-degrading enzyme from Plasmodium falciparum. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 93, n. September, p. 10034–10039, 1996.

SINGH, A. et al. Dihydroorotate dehydrogenase: A drug target for the development of antimalarials. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 125, p. 640–651, 2017.

SINNOKROT, M. O.; SHERRILL, C. D. Highly Accurate Coupled Cluster Potential Energy Curves for the Benzene Dimer: Sandwich, T-Shaped, and Parallel-Displaced Configurations. **The Journal of Physical Chemistry A**, v. 108, n. 46, p. 10200–10207, nov. 2004.

SINNOKROT, M. O.; SHERRILL, C. D. High-accuracy quantum mechanical studies of  $\pi$ - $\pi$  interactions in benzene dimers. **Journal of Physical Chemistry A**, v. 110, n. 37, p. 10656–10668, 2006.

SLIWOSKI, G. et al. Computational Methods in Drug Discovery. **Pharmacological Reviews**, v. 66, n. 1, p. 334–395, 31 jan. 2014.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE PARASITOLOGIA. **Glossário de parasitologia**. Disponível em: <[https://www.parasitologia.org.br/estudos\\_glossario.php](https://www.parasitologia.org.br/estudos_glossario.php)>. Acesso em: 11 abr. 2020.

SNEHA, P.; GEORGE PRIYA DOSS, C. Molecular Dynamics. In: **Advances in Protein Chemistry and Structural Biology**. 1. ed. [s.l.] Elsevier Inc., 2016. v. 102p. 181–224.

STEFFEN, A. et al. Improved Cyclodextrin-Based Receptors for Camptothecin by Inverse Virtual Screening. **Chemistry - A European Journal**, v. 13, n. 24, p. 6801–6809, 17 ago. 2007.

SU, X. Tracing the geographic origins of Plasmodium falciparum malaria parasites. **Pathogens and Global Health**, v. 108, n. 6, p. 261–262, 29 set. 2014.

TAO, X. et al. Recent developments in molecular docking technology applied in food science: a review. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 55, n. 1, p. 33–45, 6 jan. 2020.

TAYLOR, R. D.; JEWsbury, P. J.; ESSEX, J. W. A review of protein-small molecule docking methods. **Journal of Computer-Aided Molecular Design**, v. 16, n. 3, p. 151–166, mar. 2002.

TSE, E. G.; KORSIK, M.; TODD, M. H. The past, present and future of anti-malarial medicines. **Malaria Journal**, v. 18, n. 1, p. 93, 22 dez. 2019.

VAN DE WATERBEEMD, H. et al. Glossary of terms used in computational drug design (IUPAC Recommendations 1997). **Pure and Applied Chemistry**, v. 69, n. 5, p. 1137–1152, 1 jan. 1997.

VAN DER SPOEL, D. et al. GROMACS: Fast, flexible, and free. **Journal of Computational Chemistry**, v. 26, n. 16, p. 1701–1718, dez. 2005.

VAN VUGT, M. et al. Malaria treatment and prophylaxis in endemic and nonendemic countries: evidence on strategies and their cost–effectiveness. **Future Microbiology**, v. 6, n. 12, p. 1485–1500, dez. 2011.

VAN SCHAIJK, B. C. L. et al. Type II Fatty Acid Biosynthesis Is Essential for Plasmodium falciparum Sporozoite Development in the Midgut of Anopheles Mosquitoes. **Eukaryotic Cell**, v. 13, n. 5, p. 550–559, maio 2014.

VASCONCELOS, S. N. S. et al. Indole-3-glyoxyl tyrosine: synthesis and antimalarial activity against Plasmodium falciparum. **Future Medicinal Chemistry**, v. 11, n. 6, p. 525–538, mar. 2019.

VERLINDEN, B. K.; LOUW, A.; BIRKHOLTZ, L. M. Resisting resistance: is there a solution for malaria? **Expert Opin Drug Discov**, v. 11, n. 4, p. 395–406, 2016.

VIDADALA, R. S. R. et al. Development of potent and selective Plasmodium falciparum calcium-dependent protein kinase 4 (PfCDPK4) inhibitors that block the transmission of malaria to mosquitoes. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 74, p. 562–573, mar. 2014.

WALLIKER, D. et al. Genetic analysis of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. **Science**, v. 236, n. 4809, p. 1661–1666, 26 jun. 1987.

WANG, Z. et al. Comprehensive evaluation of ten docking programs on a diverse set of protein-ligand complexes: The prediction accuracy of sampling power and scoring power. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 18, n. 18, p. 12964–12975, 2016.

WHITE, J. et al. Identification and Mechanistic Understanding of Dihydroorotate Dehydrogenase Point Mutations in *Plasmodium falciparum* that Confer in Vitro Resistance to the Clinical Candidate DSM265. **ACS Infectious Diseases**, v. 5, n. 1, p. 90–101, 11 jan. 2019.

WHITTINGHAM, J. L. et al. Structural basis for the efficient phosphorylation of AZT-MP (3'-azido-3'-deoxythymidine monophosphate) and dGMP by *Plasmodium falciparum* type I thymidylate kinase. **Biochemical Journal**, v. 428, n. 3, p. 499–509, 15 jun. 2010.

WHO. **World Malaria Report 2018**. Geneva: World Health Organization, 2018.

WHO. **World Malaria Report 2019**. Geneva: World Health Organization, 2019.

WHO. **Neglected tropical diseases**. Disponível em: <[https://www.who.int/neglected\\_diseases/diseases/en/](https://www.who.int/neglected_diseases/diseases/en/)>. Acesso em: 19 ago. 2020.

WURTZ, N. et al. Expression and biochemical characterization of the *Plasmodium falciparum* protein kinase A catalytic subunit. **Parasitology Research**, v. 104, n. 6, p. 1299–1305, 22 maio 2009.

XU, X.; HUANG, M.; ZOU, X. Docking-based inverse virtual screening: methods, applications, and challenges. **Biophysics Reports**, v. 4, n. 1, p. 1–16, 2018.

YIN, L.-M. et al. Long Term and Standard Incubations of WST-1 Reagent Reflect the Same Inhibitory Trend of Cell Viability in Rat Airway Smooth Muscle Cells. **International Journal of Medical Sciences**, v. 10, n. 1, p. 68–72, 2013.

YURIEV, E.; RAMSLAND, P. A. Latest developments in molecular docking: 2010-2011 in review. **Journal of Molecular Recognition**, v. 26, n. 5, p. 215–239, 2013.

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.

## CAPÍTULO 7 – APÊNDICES

### 7.1 – Apêndice A. Trabalhos realizados em paralelo.

Em conjunto com o projeto “Identificação assistida por docking molecular de potenciais alvos em *Plasmodium falciparum* para derivados de indol-3-glioxiltirosina com atividade antimalárica *in vitro*”, participou-se em diferentes colaborações, as quais renderam as seguintes publicações:

- **Dávila-Rodríguez, M. J.**, Freire, T. S., Lindahl, E., Caracelli, I., Zukerman-Schpector, J., & Friedman, R. Is breaking of a hydrogen bond enough to lead to drug resistance? **Chemical Communications**, v. 56, n. 49, p. 6727-6730, 2020. DOI: 10.1039/D0CC02164D

Resultado do estágio realizado entre os dias 9 de setembro e 4 de dezembro de 2019 no Grupo de Química Computacional e Bioquímica (CCBG, do inglês *Computational Chemistry and Biochemistry Group*) do Departamento de Química e Ciências Biomédicas da Universidade de Lineu, Kalmar, Suécia, sob orientação do Prof. Dr. Ran Friedman, dentro do projeto binacional Suécia-Brasil “*Computer-aided development of potent inhibitors for wild type and mutant kinases*” coordenado pela Profa. Dra. Ignez Caracelli e o Prof. Dr. Ran Friedman e financiado pelo Conselho de Pesquisa Sueco.

- Souza, A. R. D., Boza, I. A. F., Ximenes, V. F., Yoguín, M. I., **Dávila-Rodríguez, M. J.**, Morgon, N. H., & Caracelli, I. Elucidation of the induced chirality of dansylglycine by its interaction with human serum albumin. **Química Nova**, v. 42, n. 2, p. 135-142, 2019. DOI: 10.21577/0100-4042.20170341

Resultado da parceria com o grupo do Prof. Dr. Aguinaldo Robinson de Souza do Departamento de Química, Faculdade de Ciências, Universidade Estadual Paulista, Bauru–SP, Brasil. Artigo de capa da revista.

- Balfour, M. N., Zukerman-Schpector, J., **Rodríguez, M. J. D.**, Reis, J. S., Esteves, C. H. A., & Stefani, H. A. Combination of Sonogashira coupling and 5-endo-dig cyclization for the synthesis of 2, 6-disubstituted-5-azaindoles. **Synthetic Communications**, v. 49, n. 3, p. 351-358, 2019. DOI: 10.1080/00397911.2018.1545032

Resultado da parceria com o grupo do Prof. Dr. Helio A. Stefani do Departamento de Farmácia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (FCF–USP), São Paulo–SP, Brasil.