



JEFFERSON CASCARDO PINTO

**SIMULAÇÃO COMPUTACIONAL E DINÂMICA
MOLECULAR DE DERIVADOS DA PIRIMIDINA COM A
PROTEÍNA TIROSINA FOSFATASE B DA
MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS**

**LAVRAS – MG
2023**

JEFFERSON CASCARDO PINTO

**SIMULAÇÃO COMPUTACIONAL E DINÂMICA MOLECULAR DE DERIVADOS
DA PIRIMIDINA COM A PROTEÍNA TIROSINA FOSFATASE B DA
MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS**

Monografia apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Curso de Engenharia Química, para a obtenção do título de Bacharel.

Prof. Dr. Teodorico de Castro Ramalho
Orientador

Prof. Dra. Daiana Teixeira Mancini
Coorientadora

**LAVRAS – MG
2023**

AGRADECIMENTOS

A Deus, por sempre me dar forças nos momentos difíceis e por me amparar nos momentos de solidão. Sem Ele, o sucesso dessa trajetória não seria possível.

A minha família, em especial minha mãe Lucimara e meu pai Edson, por sempre me apoiarem em todas as minhas decisões e por me encorajarem diante dos desafios da vida.

Aos meus amigos de Itajubá, em especial Cleyton Gonçalves e Guilherme Chiaradia, que considero como irmãos, além de todas as amizades cultivadas durante minha vida.

Ao meu orientador Teodorico de Castro Ramalho e coorientadora Daiana Teixeira Mancini, por terem aceitado meu convite e pela disposição, atenção e empenho no desenvolver deste trabalho, os meus sinceros agradecimentos.

RESUMO

A tuberculose é uma doença infecciosa globalmente desafiadora e enfrenta problemas como resistência a medicamentos e a necessidade de novos tratamentos eficazes. A proteína tirosina fosfatase B (PTPB) encontrada na bactéria *Mycobacterium tuberculosis*, causadora da tuberculose, é uma enzima importante na regulação de processos celulares e tem sido identificada como um alvo promissor para o desenvolvimento de novos fármacos contra a doença. Os derivados da pirimidina são compostos químicos conhecidos como potenciais inibidores da PTPB. Eles possuem a estrutura básica da pirimidina, uma molécula orgânica heterocíclica de seis membros contendo nitrogênio. Esses derivados são modificados em sua estrutura molecular para criar uma variedade de compostos com propriedades específicas. Baseado neste contexto, o presente trabalho tem como objetivo avaliar o modo de interação de onze compostos derivados da pirimidina e a enzima PTPB, através das técnicas de *docking* e simulações de dinâmica molecular, em relação as energias de interações intermoleculares e estabilização do complexo ligante-proteína. Os resultados obtidos forneceram informações valiosas sobre a interação entre os derivados da pirimidina e a PTPB da *Mycobacterium tuberculosis*, contribuindo para o desenvolvimento de novos compostos terapêuticos que possam inibir ou modular a atividade dessa enzima. Espera-se que as simulações computacionais forneçam *insights* sobre a estrutura e o comportamento das interações no sítio ativo da enzima PTPB, auxiliando na identificação de compostos promissores que possam ser alvos potenciais para o desenvolvimento de novos fármacos contra a tuberculose.

Palavras-chaves: Docking; Dinâmica molecular; Derivados da pirimidina; Proteína tirosina fosfatase B (PTPB); Tuberculose.

ABSTRACT

Tuberculosis is a globally challenging infectious disease and faces issues such as drug resistance and the need for new effective treatments. The protein tyrosine phosphatase B (PTPB) found in *Mycobacterium tuberculosis* bacteria, which causes tuberculosis, is an important enzyme in the regulation of cellular processes and has been identified as a potential target for the development of new drugs against the disease. Pyrimidine derivatives are chemical compounds that have the basic structure of pyrimidine, a six-membered nitrogen-containing heterocyclic organic molecule. These derivatives are modified in their molecular structure to create a variety of compounds with specific properties. Based on this context, the present work aims to evaluate the mode of interaction of eleven compounds between pyrimidine derivatives and the PTPB enzyme, through docking techniques and molecular dynamics simulations, in relation to the intermolecular and stabilized interaction energies of complex protein-binding. The results obtained provided valuable information about the interaction between pyrimidine derivatives and PTPB from *Mycobacterium tuberculosis*, contributing to the development of new therapeutic compounds that can inhibit or modulate the activity of this enzyme. It is expected that computer simulations will provide insights into the structure and behavior of interactions in the active site of the PTPB enzyme, helping to identify promising compounds that could be potential targets for the development of new drugs against tuberculosis.

Keywords: Docking; Molecular dynamics; Pyrimidine derivatives; Protein tyrosine phosphatase B (PTPB); Tuberculosis.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 2.1 –	Compostos derivados da pirimidina e suas propriedades farmacológicas.....	13
Figura 2.2 –	Compostos derivados da pirimidina e suas propriedades farmacológicas.....	14
Figura 5.1 –	Desenho 2D do composto derivado da pirimidina (os onze compostos se diferem pela substituição no benzeno).	21
Figura 5.2 –	Sobreposição dos compostos derivados pirimidina depois do ancoramento, em amarelo é o substrato natural, tirosina e em azul os compostos derivados pirimidina A) composto 11 ; B) composto 5 ; C) composto 1	23
Figura 5.3 –	Sobreposição dos compostos pirimidina depois do ancoramento, em amarelo é o substrato natural, tirosina e em azul os compostos derivados pirimidina A) inibidor 1 , B) inibidor 2 , C) inibidor 3 , D) inibidor 4 , E) inibidor 5 , F) inibidor 6 , G) inibidor 7 , H) inibidor 8 , I) inibidor 9 , J) inibidor 10 K) composto 11 ..	23
Figura 5.4 –	Inibidor 11 ancorado na PtpB. Os aminoácidos que fazem ligação de hidrogênio estão destacados.....	28
Figura 5.5 –	Gráfico de dispersão com os valores de correlação R e de determinação (R^2), em relação aos dados de pIC_{50} ($-\log$ dos valores de IC_{50}) ao longo do eixo x e aos dados obtidos do ancoramento de energia de interação intermolecular ao longo do eixo y.....	28
Figura 5.6 –	Análise da caixa de solvatação utilizando o programa VMD.....	30
Figura 5.7 –	Variação de temperatura ao longo da simulação por DM.....	30
Figura 5.8 –	Variação DRMQ temporal para a simulação enzima/inibidor. Sendo a curva da enzima (preto) e o ligante (vermelho).....	31
Figura 5.9 –	Variação de energia total do sistema formado pelo ligante e a enzima durante o tempo de 20 ns realizada na simulação por DM.	32
Figura 5.10 e 5.11 –	Variação da distância entre o inibidor e os resíduos Arg166 (à esquerda) e Arg59 (à direita) durante 20 ns de simulação por DM.....	33
Figura 5.12 e 5.13 –	Variação da distância entre o inibidor e os resíduos Arg63 (à esquerda) e Cys160 (à direita) durante 20 ns de simulação por DM.....	34
Figura 5.14 e 5.15 –	Variação da distância entre o inibidor e os resíduos Lys164 (à esquerda) e Ser57 (à direita) durante 20 ns de simulação por DM.	34
Figura 5.16 e 5.17 –	Variação da distância entre o inibidor e os resíduos Glu60 (à esquerda) e Ala162 (à direita) durante 20 ns de simulação por DM.	34
Figura 5.18 –	Variação da distância entre o inibidor e o resíduo Tyr 125 durante 20 ns de simulação por DM.....	34
Figura 5.19 –	Número médio de ligações de hidrogênio formado entre o inibidor e a enzima.	35

LISTA DE TABELAS

Tabela 5.1 – Inibidores e respectivas substituições no benzeno do composto da figura 5.1. ..	21
Tabela 5.2 – Valores de IC ₅₀ (concentração necessária para inibir 50% da enzima), energia de interação intermolecular (kcal mol ⁻¹) proteína/compostos derivados pirimidina e energia de ligação de hidrogênio obtidas do ancoramento.	22
Tabela 5.3 – Valores do comprimento dos ângulos (Å) das ligações de hidrogênio, energia das ligações de hidrogênio (kcal mol ⁻¹) e resíduos de aminoácidos com os quais as ligações são formadas.	24
Tabela 5.4 – Média do DRMQ temporal e desvio médio ao longo do sistema simulado.	32

LISTA DE ABREVIATURAS

Arg	Arginina
Tyr	Tirosina
Lys	Lisina
Ala	Alanina
Phe	Fenilalanina
Cys	Cisteína
Ser	Serina
Asp	Aspartato
Gly	Glicina
His	Histidina
Glu	Glutamato

LISTA DE SIGLAS

PtPb	Proteína tirosina fosfatase B
Mtb	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
DM	Dinâmica molecular
MDV	Molegro virtual Docker
PDB	Protein Data Bank
DRMQ	Desvio da raiz média quadrática
VMD	Visual Molecular Dynamics
OMS	Organização mundial da saúde
IC	Concentração inibitória

LISTA DE SÍMBOLOS

Å	Angstrom (unidade de medida de comprimento)
K	Kelvin (unidade de temperatura)
Ki	Constante de inibição
nm	Nanômetro (unidade de medida de comprimento)
ns	Nanossegundos (unidade de medida de tempo)
ps	Picossegundos (unidade de medida de tempo)
mi	Massa atômica
ai	Aceleração do átomo
ri	Posição do átomo
μ	Micro
cal	Caloria (unidade de energia)
J	Joule (unidade de energia)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	10
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	11
2.1	Tuberculose	11
2.2	<i>Mycobacterium Tuberculosis</i>	11
2.3	Diagnóstico e Tratamento.....	12
2.4	Proteína tirosina fosfatase B da <i>Mycobacterium Tuberculosis</i> e derivados da pirimidina	12
2.5	Química computacional.....	14
2.6	Ancoramento Molecular.....	15
2.7	Dinâmica Molecular	16
3	OBJETIVOS.....	18
3.1	Objetivo Geral	18
3.2	Objetivos Específicos	18
4	METODOLOGIA	19
4.1	Ancoramento Molecular.....	19
4.2	Dinâmica Molecular	19
4.3	Análise de Estruturas e Obtenção de Figuras e Gráficos	20
5	RESULTADOS E DISCUSSÕES	21
5.1	Estudos por Ancoramento Molecular	21
5.2	Gráfico de Dispersão dos Valores	28
5.3	Estudos por Dinâmica Molecular	29
5.4	Análise do Sistema na Caixa de Solvatação.....	29
5.5	Análise da Temperatura.....	30
5.6	Análise dos Gráficos de Desvio Padrão	31
5.7	Variação de Energia.....	32
5.8	Interação do Ligante com Resíduos do Sítio Ativo da Enzima.....	33
6	CONCLUSÃO.....	36
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	37
	APÊNDICE – PROGRAMAS DO PACOTE GROMACS 4.0	40

1 INTRODUÇÃO

A tuberculose é uma doença infecciosa causada pelo microrganismo *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb). A doença é disseminada pelo ar, através de gotículas provenientes de espirros ou tosse de uma pessoa contaminada. A propagação depende do sistema imunológico do receptor, sendo mais comum em portadores de câncer, diabetes, vírus HIV e outros problemas de saúde (Ferri et al., 2014; Braga et al., 2011).

Os métodos mais utilizados para detectar a doença são os exames bacteriológicos. Entre as técnicas realizadas para a elaboração dos exames estão os testes de coloração, baciloscopia, um método fundamental que consiste no exame direto do escarro, cultura para micobactéria e exames de imagem, como radiografias do tórax (Busatto et al., 2015; Anvisa, 2010).

O tratamento da doença é feito com medicamentos convencionais, como Rifampicina, Etambutol, Pirazinamida e Isoniazida. Esses medicamentos são altamente eficientes e fáceis de administrar. No entanto, com o tempo, a bactéria desenvolve mutações e adquire resistência, tornando necessário a busca constante por novos alvos terapêuticos e o desenvolvimento de novos medicamentos para o tratamento da tuberculose (Bagchi, 2023).

A proteína tirosina fosfatase B (PtpB) tem sido identificada como um alvo promissor no tratamento da tuberculose, podendo afetar a sobrevivência da bactéria no hospedeiro, o que abre oportunidades para o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas (Pal et al., 2022).

A síntese de compostos derivados da pirimidina vem se destacando na química medicinal, para a estruturação e estudo dos seus desempenhos farmacológicos. Por exemplo, o composto pirano [2,3-d] pirimidina, quando conectado a uma determinada molécula, seu derivado apresenta características farmacêuticas inerentes em compostos bioativos, como antígeno, antituberculares, antifúngicos e antibacterianos. (Thanh et al., 2019)

Através do uso das técnicas de *docking* e dinâmica molecular de compostos derivados da pirimidina e a proteína tirosina fosfatase B da *Mycobacterium tuberculosis*, é possível um melhor entendimento de como esses compostos interagem com o sítio ativo dessa enzima, avaliando as estruturas dos compostos em relação as suas conformações no sítio ativo da proteína e suas energias de interações envolvidas, além da identificação de quais resíduos de aminoácidos fazem parte da estabilização dos respectivos complexos.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Tuberculose

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), a tuberculose é a doença infecciosa que mais mata em todo o mundo. Em 2021, estimou-se cerca de 10,6 milhões de casos de tuberculose no mundo, resultando em um total de 1,6 milhão de óbitos devido à doença (OMS, 2022).

A compreensão da doença melhorou em 1882, quando o alemão Robert Koch identificou a *Mycobacterium tuberculosis* como a origem da tuberculose, trazendo esperança para o tratamento da doença. Posteriormente, em 1943, o primeiro agente antituberculose, a estreptomicina, foi isolado e testado. Ao longo dos anos, novos agentes foram descobertos, como a rifampicina, isoniazida e pirazinamida, contribuindo para o controle da doença (Blevins, 2010).

Os principais sintomas da doença incluem tosse, febre, falta de ar, fraqueza, expectoração e, em alguns casos, hemoptise, dor torácica, perda de peso e fadiga excessiva (Borgdorff et al., 2002). A tosse é o primeiro sintoma que surge nos infectados, seguida pela expectoração. Muitas vezes, esses sintomas passam despercebidos, confundindo-se com uma gripe ou problemas respiratórios relacionados ao tabaco. Isso aumenta o tempo entre o aparecimento dos sintomas e o diagnóstico da doença, dificultando o tratamento e permitindo que o escarro se torne bacilífero e contage outras pessoas (Conde et al., 2009).

2.2 *Mycobacterium Tuberculosis*

Pertencem à família Mycobacteriaceae, composta por dois gêneros, *Mycobacterium* e *Mycobacterium*, sendo este último de maior importância clínica. A *Mycobacterium tuberculosis*, também conhecida como bacilo de Koch, passou por uma sequência de mutações, evoluindo de bactérias saprófitas para bactérias parasitas de mamíferos. Os primeiros contatos com a raça humana foram causados pelo consumo de carne crua ou mal cozida, resultando na contração da *Mycobacterium bovis* (Steele JH et al., 1995). As micobactérias são intracelulares facultativas, possuem crescimento lento e são predominantemente aeróbias. Suas paredes celulares são complexas, contendo proteínas, lipídios e carboidratos (Groisman et al., 1997).

Assim como muitas outras bactérias, a *Mycobacterium tuberculosis* evoluiu ao longo do tempo, adquirindo resistência a medicamentos. Alguns fatores específicos da micobactéria que contribuem para isso são a variação de permeabilidade a diferentes compostos, a produção de

enzimas que modificam ou destroem fármacos, e a modificação espontânea dos genes alvos das drogas (Nikaido et al., 1994).

Essa bactéria é quase exclusivamente um parasita humano e geralmente causa tuberculose pulmonar, uma infecção que afeta os pulmões. No entanto, ela também é capaz de infectar outros órgãos ou tecidos do corpo (Pelczar et al., 1996).

2.3 Diagnóstico e Tratamento

Até hoje, muitos países onde a tuberculose é prevalente utilizam o método de longa data chamado microscopia de escarro para diagnosticar os bacilos da tuberculose. No entanto, a microscopia detecta apenas metade dos casos de tuberculose e não identifica a possibilidade de resistência a medicamentos nos pacientes. Sua efetividade é ainda menor em portadores de HIV e crianças (Bagchi, 2023).

Além da bacteriologia, outros métodos são utilizados para a identificação da doença, como exames radiológicos, histopatológicos, sorológicos e a prova tuberculínica. Esses métodos podem variar em custo e complexidade (Rosendo; Bezerra; De Lima, 2020).

O teste Xpert MTB/RIF teve sua popularidade aumentada consideravelmente. Esse teste detecta tanto a tuberculose quanto a resistência à rifampicina, que é o medicamento mais importante no tratamento da tuberculose (Lima et al., 2017).

A tuberculose é uma doença grave, porém tratável e curável. O tratamento dura no mínimo seis meses e, na maioria dos casos, utiliza-se os antibióticos rifampicina, isoniazida, pirazinamida e etambutol. Esses medicamentos são fornecidos juntamente com informações e apoio ao paciente por um profissional de saúde (Bagchi, 2023).

Os pacientes que não respondem ao tratamento mencionado, aqueles que possuem bacilos resistentes aos medicamentos, são classificados como portadores de tuberculose multirresistente, de acordo com o Consenso Brasileiro de Tuberculose de 1997. O tratamento para esses pacientes pode durar até dois anos e causar diversos efeitos colaterais graves. Além disso, é um tratamento custoso e possui uma baixa taxa de cura. Isso destaca a necessidade contínua de descobrir novos alvos terapêuticos para o tratamento da tuberculose como, por exemplo, a enzima tirosina fosfatase B. (Johnston et al., 2009).

2.4 Proteína tirosina fosfatase B da *Mycobacterium Tuberculosis* e derivados da pirimidina

As proteínas tirosina fosfatase e quinase são importantes enzimas, pois estão relacionadas ao controle do nível de fosforilação dos alvos de seus substratos proteicos. A

fosforilação desempenha um papel crucial em diversos eventos celulares, como resposta imune, crescimento, metabolismo e transcrição de genes (Bialy et al., 2005).

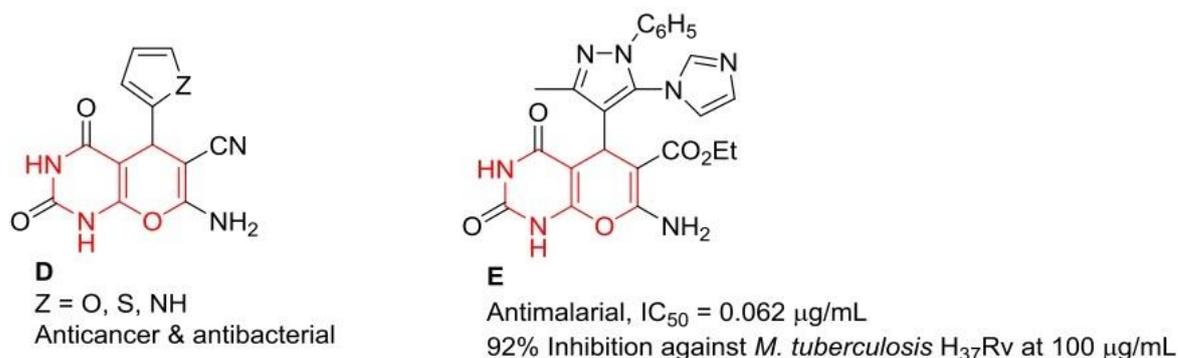
As enzimas PtpA e PtpB foram identificadas no genoma do *Mycobacterium tuberculosis*. Essas enzimas se tornam alvos promissores para o desenvolvimento de novos fármacos inovadores contra a doença, uma vez que podem afetar a sobrevivência da bactéria no hospedeiro (Mascarello et al., 2016).

A *Mycobacterium tuberculosis*, causadora da tuberculose, é um patógeno de grande importância em saúde pública, e a PtpB é uma enzima essencial para a sobrevivência desse organismo. Portanto, compreender as interações entre essa proteína e derivados da pirimidina pode fornecer informações valiosas para o desenvolvimento de inibidores seletivos e eficazes.

A síntese de compostos derivados da pirimidina tem despertado a atenção no campo da química medicinal, devido à grande diversidade de propriedades farmacológicas que eles apresentam. Esses compostos atuam em enzimas específicas de bactérias, interferindo nos processos enzimáticos e no ciclo de vida do alvo. (Thanh et al., 2019; Sathisha; Gopala; Rangappa, 2016)

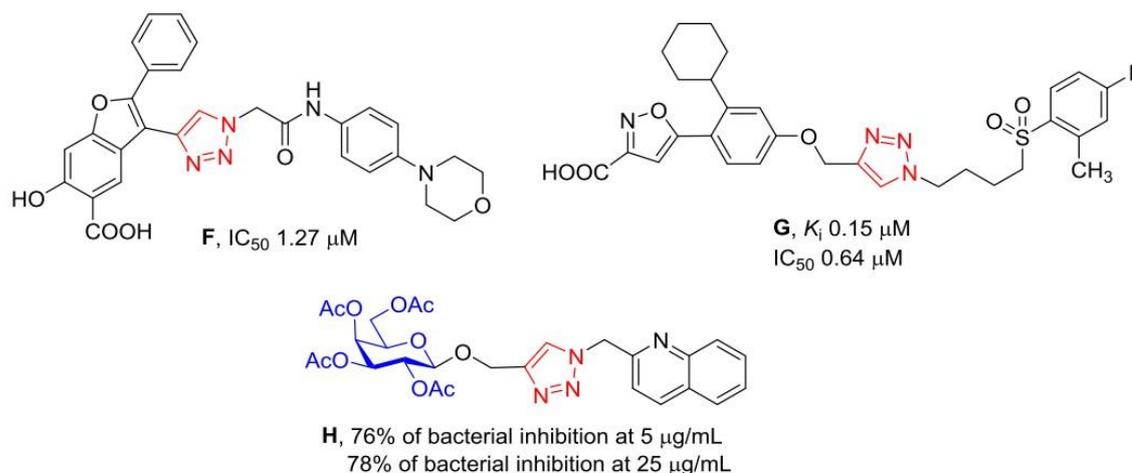
A pirano[2,3-d]pirimidina é um sistema heterocíclico e insaturado. Quando conectada a uma determinada molécula, seu derivado apresenta um aumento na atividade farmacêutica em compostos bioativos. Estudos realizados por Kamdar et al. demonstraram que essa fração do composto pirimidina, quando sintetizada com um anel de quinolina, resultou em uma maior atividade antituberculose. Sabry et al. indicaram que a benzopirano[2,3-d]pirimidina com substituintes de cloro e bromo possui atividade inibitória contra algumas bactérias. Além disso, Dangolani et al. relataram que a síntese dessa fração pirimidina com um anel contendo vários substituintes hidróxido apresentou atividade antioxidante, as figuras 2.1 e 2.2 apresentam os compostos com suas respectivas propriedades farmacológicas. (Thanh et al., 2019).

Figura 2.1 – Compostos derivados da pirimidina e suas propriedades farmacológicas.



Fonte: Than et al. (2019)

Figura 2.2 – Compostos derivados da pirimidina e suas propriedades farmacológicas.



Fonte: Than et al. (2019)

Através do uso da química computacional e técnicas de modelagem molecular, é possível estudar e entender as interações moleculares entre esses derivados da pirano[2,3-d]pirimidina e a enzima PtpB. Essas abordagens computacionais permitem prever a conformação e a afinidade de ligação dos compostos, facilitando o design racional de moléculas com propriedades desejadas.

2.5 Química computacional

As simulações de *docking* e dinâmica molecular têm desempenhado um papel crucial na investigação de interações entre moléculas e proteínas, proporcionando *insights* valiosos para o desenvolvimento de novos compostos terapêuticos. No contexto específico do estudo de derivados da pirimidina com a proteína tirosina fosfatase B (PtpB) da *Mycobacterium tuberculosis*, a Química Computacional se mostra uma abordagem promissora (LEITE; LIMA; GUIDO, 2019).

As simulações computacionais permitem a modelagem detalhada da estrutura molecular dos derivados da pirimidina e da PtpB, bem como a previsão de suas interações. Por meio de métodos de dinâmica molecular, é possível simular a dinâmica dos átomos e analisar as mudanças conformacionais da PtpB quando interage com diferentes compostos da pirimidina. Essas simulações fornecem uma visão dinâmica das interações moleculares, auxiliando na compreensão dos mecanismos de ligação e na identificação de regiões-chave para o desenvolvimento de ligantes específicos.

Além disso, segundo Santos (2020), a Química Computacional também permite a realização de estudos de propriedades físico-químicas relevantes, como energia de ligação,

solubilidade e estabilidade dos complexos formados. Essas informações são fundamentais para a seleção e otimização de compostos promissores, contribuindo para a racionalização do processo de descoberta de fármacos.

2.6 Ancoramento Molecular (“*docking*”)

A técnica de ancoramento molecular é um processo fundamental na predição da conformação de um ligante e sua orientação dentro de um possível alvo de ligação. Esta abordagem é comumente utilizada na análise de complexos formados por proteínas e ligantes, tornando-se uma técnica amplamente empregada na etapa de planejamento e desenvolvimento de novos medicamentos. Esse tipo de simulação visa encontrar a estrutura mais estável do complexo proteína-ligante e calcular sua estabilidade relativa (LOPES & PIETRO, 2017).

A simulação computacional de ancoramento molecular (“*docking*”) apresenta dois elementos-chave: amostragem e pontuação. A amostragem desempenha o papel de gerar as configurações (orientações e conformações) do ligante no sítio de ligação (complexo). A etapa de pontuação consiste na previsão da energia de ligação, estabelecendo valores e selecionando as configurações com menores valores de energia. (HUANG e ZOU, 2010)

A pontuação do ancoramento, ou "Docking Scoring Function", é determinada pela equação (1):

$$E_{score} = E_{inter} + E_{intra} \quad (1)$$

O termo E_{inter} corresponde à energia de interação entre o ligante e a proteína e é calculado pela equação (2):

$$E_{inter} = \sum_{i \in \text{ligante}} \sum_{j \in \text{ligante}} \left[E_{PLP}(r_{ij}) + 332,0 * \frac{(q_i * q_j)}{4 * r_{ij}^2} \right] \quad (2)$$

O primeiro termo, E_{PLP} , representa a energia potencial do inibidor dividida em duas partes: uma para o termo estérico (van der Waals) entre átomos e outra para o potencial de ligação de hidrogênio. O segundo termo descreve as interações eletrostáticas entre átomos carregados, sendo um potencial de Coulomb com uma constante dielétrica dependente da distância.

O termo E_{intra} , que corresponde à energia interna do ligante, é definido pela equação 3:

$$E_{inter} = \sum_{i \in \text{ligante}} \sum_{j \in \text{ligante}} E_{PLP}(r_{ij}) + \sum_{\text{flexíveis}} \text{Ligações} A * [1 - \cos(m\theta - \theta_0)] + E_{penalizada} \quad (3)$$

As duas primeiras somatórias referem-se a todos os pares de átomos no ligante, excluindo os pares de átomos conectados por duas ligações. O segundo termo refere-se à energia de torção, onde Θ representa o ângulo de torção da ligação. Se várias torções forem possíveis, é calculada a média das contribuições de torção das ligações. O último termo, $E_{\text{penalizada}}$, é um termo de correção que penaliza conformações inexistentes do ligante, atribuindo uma penalidade de 1000 se a distância entre dois átomos pesados (com mais de duas ligações de distância) for menor que 2,0 Å. (Khan et al., 2009; Thomsen; Christensen, 2006; Josa et al., 2008)

A seleção das melhores conformações resultantes de cálculos de ancoramento molecular pode ser determinada pela comparação com a conformação de um ligante já presente na estrutura cristalográfica da proteína e levando em consideração os valores de energia mais estáveis obtidos. A busca pela estrutura de menor energia, sem fazer suposições prévias, requer uma análise completa de todas as interações, levando em consideração a flexibilidade conformacional do ligante que será inserido no sítio ativo da proteína. Uma vez que esses dois problemas estão intimamente relacionados, eles podem ser abordados simultaneamente. No entanto, o número de combinações envolvidas é significativamente elevado. (Kitchen et al., 2004; Salmaso; Stefano, 2018)

2.7 Dinâmica Molecular

A dinâmica molecular (DM) é uma técnica que possibilita a simulação dos movimentos das partículas em um sistema ao longo de um intervalo de tempo, por meio de equações de movimento e princípios da mecânica clássica, relacionando os movimentos e distribuições de átomos e moléculas que constituem o sistema (NAIR; MINERS, 2014).

Com o passar do tempo, houve um aumento na tendência de novas tecnologias nos últimos anos, incluindo a colaboração da informática na química medicinal, principalmente por meio da química computacional, que possibilita estudos de dinâmica e modelagem molecular. Dessa forma, torna-se possível o planejamento virtual de novos ligantes para determinados sítios ativos por meio da elaboração de mapas farmacofóricos (VIEGAS; BOLZANI; BARREIRO, 2006).

A DM é uma técnica amplamente utilizada no estudo de macromoléculas biológicas, contribuindo para diversos estágios do processo de planejamento racional de fármacos baseado em estrutura (NAMBA; SILVA; SILVA, 2008).

Para realizar os cálculos de DM, é necessário resolver as equações de movimento de Newton, a fim de determinar o conjunto de interações e posições entre os átomos em cada intervalo de tempo. Essas equações podem ser descritas pelas equações 4 e 5:

$$F_i(t) = m_i a_i \quad (4)$$

$$F_i(t) = \frac{-\partial V r_i}{\partial r_i} \quad (5)$$

Onde F_i representa a força atuando sobre cada partícula em um determinado instante de tempo t , m_i é a massa atômica, a_i é a aceleração do átomo e r_i é a posição do átomo.

As equações 4 e 5 são resolvidas simultaneamente, resultando em um conjunto de equações de movimento para cada partícula do sistema, fornecendo a trajetória de cada átomo do sistema em um determinado tempo (NAMBA; SILVA; SILVA, 2008).

Para realizar a simulação de DM, é necessário estabelecer condições iniciais específicas, como as posições iniciais das partículas que compõem o sistema, geralmente localizadas em pontos de uma rede cristalina, evitando assim sobreposições indesejáveis entre elas. O sistema é confinado em uma caixa, frequentemente uma caixa cúbica. Para sistemas biomoleculares, moléculas de água são adicionadas e um modelo de condição é utilizado para permitir que essas moléculas escapem do meio. Posteriormente, o sistema é minimizado para evitar possíveis contatos inadequados entre os átomos (NAMBA; SILVA; SILVA, 2008).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Estudar o comportamento dos inibidores derivados da pirimidina no sítio ativo da proteína tirosina fosfatase B (PtpB), através de cálculos de *docking* e dinâmica molecular, a fim de contribuir para o desenvolvimento de fármacos contra a *Mycobacterium Tuberculosis*.

3.2 Objetivos Específicos

- Estudar o modo de interação de onze derivados da pirimidina no sítio ativo da proteína tirosina fosfatase B da *Mycobacterium Tuberculosis*, utilizando-se da técnica de ancoramento molecular (*docking*);
- Estudar o comportamento de um inibidor no sítio ativo da PtpB, através de cálculos de dinâmica molecular, comparando os resultados com o estudo de *docking*.
- Cálculos de energia total do sistema, raiz quadrada do desvio quadrático médio da proteína e do ligante, número de ligações de hidrogênio, distâncias interatômicas e propriedades dinâmicas da interação proteína-ligante através de simulações por dinâmica molecular;

4 METODOLOGIA

4.1 Ancoramento Molecular

Os onze compostos derivados da pirimidina e seus respectivos valores de IC₅₀ foram retirados de um artigo recente sobre a Tuberculose e possíveis compostos alvos para o tratamento da doença (Thanh et al., 2019). As moléculas foram desenhadas e otimizadas, utilizando o programa Gaussview 5.0 e Gauss 09W. Em seguida, foi feito o cálculo das suas cargas parciais atômicas, utilizando o programa Spartan Pro. Obteve-se a estrutura cristalográfica da proteína por meio do site do PDB (Protein Data Bank, código: 2OZ5).

Posteriormente, iniciou-se o ancoramento molecular com o programa Molegro Virtual Docking, onde foram calculadas as energias de interação intermolecular e as ligações de hidrogênio entre os onze compostos e a proteína.

4.2 Dinâmica Molecular

Primeiramente, foi necessário a preparação dos arquivos do inibidor para a simulação por dinâmica molecular (DM), onde foram gerados arquivos de parametrização dos arquivos .pdb do ligante. Essa etapa é importante, pois o campo de força GROMOS 96 (53a6), escolhido do pacote de software GROMACS 4.0 (GRoningen MACHine for Chemical Simulations) (SPOEL et al., 2001), precisa reconhecer esses arquivos para então dar início às etapas de otimização e dinâmica molecular. Os arquivos de parametrização foram gerados através do Automated Topology Builder (ATB) (<https://atb.uq.edu.au/>) (Molid: 369978), onde suas cargas foram corrigidas e, assim, foi possível a obtenção dos arquivos de topologia e coordenadas do inibidor.

Para o complexo enzima-ligante, foi utilizado o pacote GROMACS 4.0 para realizar a simulação, com uma caixa cúbica de aproximadamente 390 nm³, contendo cerca de 10800 moléculas de água. O sistema foi minimizado utilizando o campo de força GROMOS 96, que está contido no GROMACS 4.0 (SPOEL et al., 2001).

Para minimizar a energia do sistema em estudo, foram empregados os algoritmos de máximo declive com restrição de posição dos ligantes, máximo declive sem restrição de posição, gradientes conjugados sem restrição e quasi Newton raphson. Os complexos minimizados foram, então, submetidos à dinâmica molecular em duas etapas.

Após a etapa de minimização do sistema, foram realizadas simulações de equilíbrio de 10000 ps a 300K com restrição de posições para todo o sistema, exceto para as moléculas de água, a fim de garantir o equilíbrio e permitir que elas possam se adaptar ao longo da superfície

e atingir um estado de equilíbrio termodinâmico. Em seguida, foi realizada a simulação de dinâmica molecular por 20000 ps a 300K sem restrição para o sistema. Para essas simulações, foram aplicados um raio de corte de 10 Å para interações de longa distância e um tempo de integração de 2 fs.

O processo para a criação dos arquivos de entrada e a execução da otimização e dinâmica utilizando o pacote GROMACS 4.0 está descrito no Apêndice A.

4.3 Análise de Estruturas e Obtenção de Figuras e Gráficos

Posterior à realização da simulação de dinâmica molecular, foi possível gerar e analisar os gráficos do sistema estudado através do programa Origin (EDWARDS, 2002). Isso inclui gráficos de energia total, RMSD da proteína e do ligante, número de ligações de hidrogênio, distâncias interatômicas, temperatura e pressão. Esses gráficos fornecem informações importantes sobre a estabilidade e as propriedades dinâmicas da interação proteína-ligante, permitindo uma compreensão mais aprofundada do mecanismo molecular envolvido na ligação, por meio da análise do comportamento dinâmico do complexo. Para visualizar a estrutura do complexo durante cada instante de tempo simulado, utilizou-se o programa Visual Molecular Dynamics (VMD) (HUMPHREY; DALKE & SCHULTEN, 1996).

Tabela 5.2 – Valores de IC₅₀ (concentração necessária para inibir 50% da enzima), energia de interação intermolecular (kcal mol⁻¹) proteína/compostos derivados pirimidina e energia de ligação de hidrogênio obtidas do ancoramento.

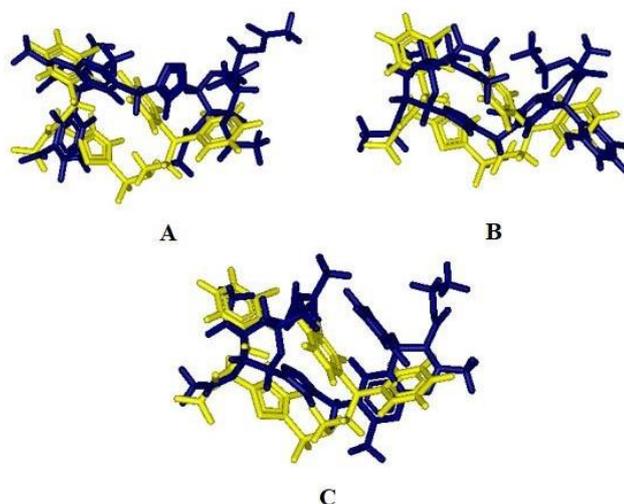
Inibidores	IC ₅₀ (μM)	Energia de Interação intermolecular	Energia de ligação hidrogênio
1	47,03	-187,227	-13,0584
2	45,01	-196,815	-18,3983
3	35,13	-202,250	-8,49718
4	33,21	-204,165	-14,1155
5	28,96	-202,238	-14,4627
6	28,24	-211,549	-21,9439
7	7,94	-213,282	-15,6043
8	7,51	-217,537	-12,7456
9	2,22	-224,294	-11,5256
10	3,53	-226,331	-12,8868
11	1,56	-227,844	-24,7966

Fonte: autor.

Como pode ser visto na Tabela 5.2, o menor valor de IC₅₀ corresponde a um menor valor de energia de interação intermolecular (energia mais estável, -227,844 kcal mol⁻¹), assim como o maior valor de IC₅₀ corresponde a um maior valor de energia de interação intermolecular (energia menos estável, -187,227 kcal mol⁻¹), ou seja, os dados teóricos obtidos do ancoramento da enzima tirosina fosfatase B da *Mycobacterium tuberculosis* estão de acordo com os resultados experimentais descritos por Thanh e colaboradores (N.D. Thanh et al., 2019). O composto **11** apresenta um valor mais estável de energia de interação, ou seja, possui uma maior interação com o sítio ativo da PtpB e, conseqüentemente, um maior potencial de inibição. Já o composto **1** apresenta uma energia de interação menos estável do que os outros compostos, ou seja, possui uma menor interação com o sítio ativo e, com isso, um menor potencial inibitório.

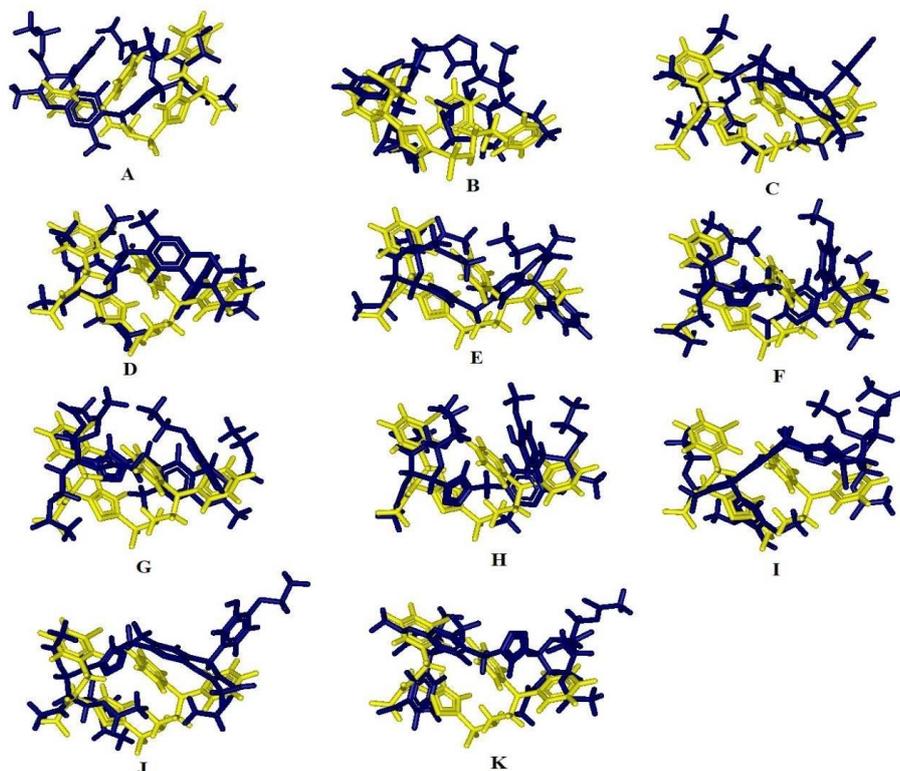
Com o *docking*, foi possível observar que o composto **11** (Figura 5.2-A) foi o que melhor se posicionou (sobreposição e orientação dos anéis), no interior do sítio ativo, com relação à tirosina. O composto **5** (Figura 5.2-B) apresentou uma sobreposição intermediária comparada aos outros compostos. Por fim, o composto **1** (Figura 5.2-C) não possui uma boa sobreposição no ligante ativo (tirosina) e nem uma conformação satisfatória.

Figura 5.2 – Sobreposição dos compostos derivados pirimidina depois do ancoramento, em amarelo é o substrato natural, tirosina e em azul os compostos derivados pirimidina A) composto 11; B) composto 5; C) composto 1.



Fonte: autor.

Figura 5.3 – Sobreposição dos compostos pirimidina depois do ancoramento, em amarelo é o substrato natural, tirosina e em azul os compostos derivados pirimidina A) inibidor 1, B) inibidor 2, C) inibidor 3, D) inibidor 4, E) inibidor 5, F) inibidor 6, G) inibidor 7, H) inibidor 8, I) inibidor 9, J) inibidor 10 K) composto 11.



Fonte: autor.

Outro ponto importante para analisar é a ligação de hidrogênio que cada composto realiza com a enzima, assim, torna-se mais fácil de visualizar quais são os resíduos de aminoácidos que estão interagindo mais fortemente aos compostos derivados pirimidina (Tabela 5.3).

Tabela 5.3 – Valores do comprimento dos ângulos (Å) das ligações de hidrogênio, energia das ligações de hidrogênio (kcal mol⁻¹) e resíduos de aminoácidos com os quais as ligações são formadas.

Composto	Comprimento de ligação	Energia de ligação de hidrogênio	Resíduo de Aminoácidos
1	3,37236	-1,13818	Arg 59
	3,46975	-0,651257	Tyr 125
	2,34789	-0,399099	Lys 164
	3,22937	-0,818014	Arg 166
	3,26254	-0,950167	Arg 166
	3,00138	-2,5	Arg 166
	2,85258	-2,5	Ala 162
	3,18626	-1,60132	Phe 161
	2,79779	-2,5	Cys 160
2	2,96286	-2,5	Tyr 125
	3,30033	-1,49836	Arg 166
	3,13195	-2,34026	Arg 166
	2,94081	-2,32077	Ala 162
	3,32537	-0,921127	Cys 160
	3,31338	-1,03276	Cys 160
	3,21792	-1,31257	Phe 161
	2,86720	-2,5	Arg 166
	3,10581	-2,47093	Arg 63
2,48019	-1,50158	Ser 57	
3	2,87503	-0,105032	Arg 63
	3,12424	-2,37881	Arg 63
	2,98344	-2,5	Arg 59
	3,19919	-2,00404	Ser 57
	2,81473	-0,999902	Arg 166

	3,55111	-0,244454	Tyr 125
	2,90407	-2,5	Tyr 125
	2,04285	2,23609	Lys 164
	3,57132	-0,143425	Arg 63
	3,39241	-1,03797	Arg 59
	2,77925	-2,5	Ser 57
	3,05487	-2,5	Lys 164
4	2,46646	-1,21603	Lys 164
	3,12703	-0,198475	Arg 166
	2,79072	-2,14776	Arg 166
	2,90038	-1,98999	Arg 166
	3,12358	-2,38212	Cys 160
	3,55969	-0,201557	Lys 164
	2,91289	-2,5	Lys 164
	3,55820	-0,152694	Cys 160
	2,90118	-2,04263	Arg 166
5	3,21320	-1,2393	Arg 166
	3,10489	-2,47557	Tyr 125
	2,77011	-2,5	Arg 59
	3,42977	-0,85116	Arg 63
	2,62605	-2,5	Ser 57
	3,02204	-2,5	Arg 59
	2,59889	-2,49078	Arg 59
	2,99941	-2,5	Ser 57
	3,44557	-0,772139	Tyr 125
	3,45404	-0,729808	Tyr 125
	3,26609	-0,00110099	Arg 166
	3,56194	-0,190277	Arg 166
6	3,44528	-0,524128	Phe 161
	2,61236	-2,5	Cys 160
	2,76450	-2,32987	Ala 162
	3,43437	-0,599452	Gly 163
	2,51676	-1,80634	Lys 164
	2,63866	-2,5	Asp 165
	2,97554	-2,5	Lys 164

7	2,72868	-2,5	Tyr 125
	3,34864	-1,25678	Tyr 125
	2,49251	-1,60422	Arg 59
	3,06199	-2,5	Arg 59
	2,68858	-2,23668	Cys 160
	3,00870	-0,506673	Gly 163
	2,73453	-2,5	Lys 164
	3,01686	-2,5	Asp 16
8	2,43261	-1,10508	Ser 57
	3,00038	-0,733306	Arg 166
	3,08444	-2,5	Tyr 125
	3,10395	-0,302746	His 94
9	3,19237	-2,03814	Arg 63
	2,84027	-2,5	Ser 57
	3,55589	-0,061918	Glu 60
	3,23477	-1,82614	Tyr 125
	3,11708	-2,4146	Tyr 125
	3,51601	-0,419964	Arg 166
	2,27301	0,234721	Arg 166
	2,84197	-2,5	Lys 164
10	2,36209	-0,517446	Arg 63
	3,10694	-2,46529	Arg 59
	3,51526	-0,423708	Ser 57
	2,74155	-2,5	Arg 166
	3,39570	-0,707975	Arg 166
	3,15572	-1,93199	Phe 161
	3,05084	-0,369683	Ala 162
	2,81502	-2,5	Cys 160
	3,18831	-2,05845	Lys 164
	2,22996	0,609028	Lys 164
	3,44252	-0,0213485	Tyr 130
11	2,74715	-1,89832	Arg 63
	3,04058	-2,5	Arg 59
	3,17732	-2,11339	Ser 57
	3,43015	-0,849235	Tyr 125

3,01230	-2,5	Asp 165
2,76403	-1,84465	Arg 166
3,43567	-0,538273	Arg 166
3,43761	-0,811929	Lys 164
3,36789	-1,16055	Arg 166
2,40844	-0,903708	Cys 160
2,98403	-2,5	Cys 160
3,43690	-0,815501	Ala 162
3,24867	-1,75667	Phe 161
3,55654	-0,195562	Arg 166
2,72896	-2,5	Arg 166
2,52903	-1,9086	Lys 164

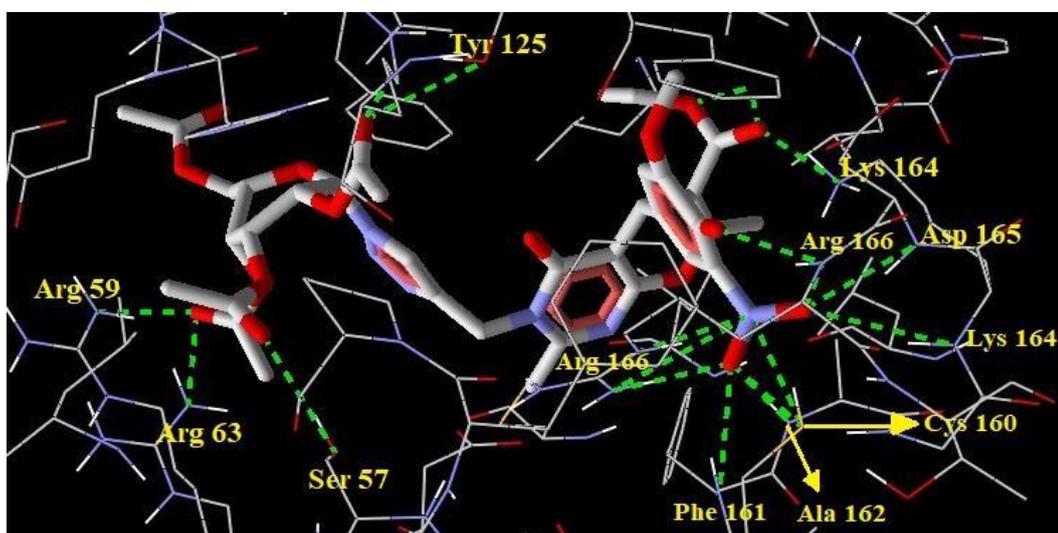
Fonte: autor.

O composto **1** apresenta, no total, nove interações de hidrogênio com os aminoácidos que estão próximos ao sítio ativo da enzima. Seguindo, o composto **2** faz dez interações, o composto **3** faz oito interações, o composto **4** faz nove interações, o composto **5** faz nove interações, o composto **6** faz quatorze interações, o composto **7** faz oito interações, o composto **8** faz quatro interações, o composto **9** faz oito interações, o composto **10** faz onze interações e, por último, o composto **11** faz dezesseis interações.

Observa-se, na Tabela 5.3, que as ligações mais estáveis que o composto **1** realiza são com os aminoácidos Arg 166; Ala 162; Cys 160. Seguindo, o composto **2** com os aminoácidos Tyr 125; Arg 166, o composto **3** com os aminoácidos Arg 59; Tyr 125, o composto **4** com os aminoácidos Ser 57; Lys 164, o composto **5** com os aminoácidos Lys 164; Arg 59; Ser 57, o composto **6** com os aminoácidos Ag 59; Ser 57; Cys 160; Asp 165; Lys 164, o composto **7** com os aminoácidos Tyr 125; Arg 59; Lys 164; Asp 165, o composto **8** com o aminoácido Tyr 125, o composto **9** com os aminoácidos Ser 57; Lys 164, o composto **10** com os aminoácidos Arg 166; Cys 160 e, por fim, o composto **11** com os aminoácidos Arg 59; Asp 165; Cys 160; Arg 166.

Como pode ser visto na Figura 5.4, o composto **11** realiza cinco ligações de hidrogênio com o resíduo Arg 166, duas ligações de hidrogênio com o resíduo Cys 160. Outras ligações significativas são observadas entre o resíduo Arg 59 e Asp 165. Sendo o inibidor que apresentou um maior número de ligações de hidrogênio com o sítio ativo da enzima, demonstra mais uma vez sua maior atividade em relação aos outros compostos.

Figura 5.4 – Inibidor **11** ancorado na PtpB. Os aminoácidos que fazem ligação de hidrogênio estão destacados.

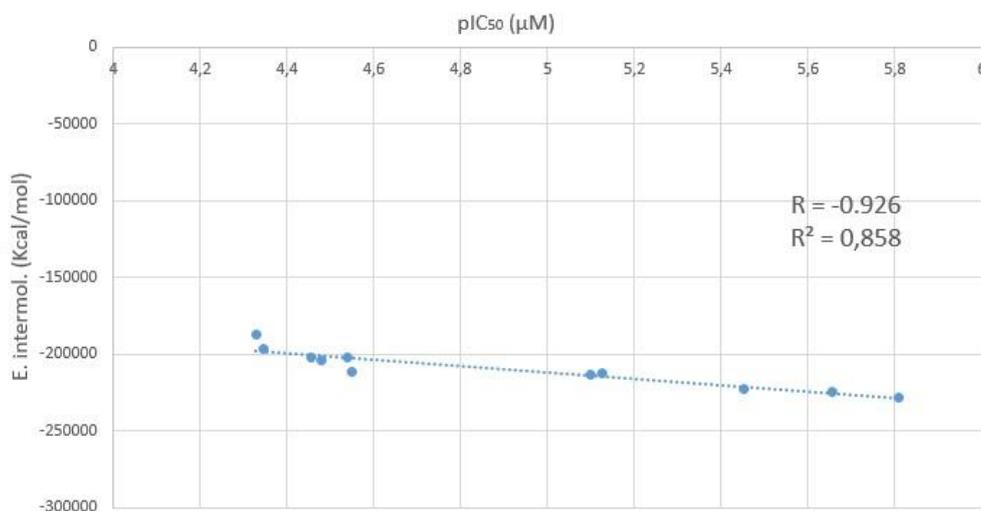


Fonte: autor.

5.2 Gráfico de Dispersão dos Valores

Além de analisar cada inibidor, foi feito um gráfico de dispersão com os valores das constantes inibitórias de cada composto com as suas respectivas energias de interação intermolecular obtidas do ancoramento molecular, a fim de calcular os coeficientes de correlação e determinação.

Figura 5.5 – Gráfico de dispersão com os valores de correlação R e de determinação (R^2), em relação aos dados de pIC_{50} ($-\log$ dos valores de IC_{50}) ao longo do eixo x e aos dados obtidos do ancoramento de energia de interação intermolecular ao longo do eixo y.



Fonte: autor.

Utilizando-se uma ferramenta de regressão linear, foram feitos os cálculos e o gráfico, obtendo um valor de correlação de -0.926 e um valor de determinação de 0,858, indicando uma boa distribuição dos valores, sendo próxima de 1 (em módulo). Isso indica que os resultados teóricos obtidos do ancoramento dos 11 compostos derivados pirimidina no sítio ativo da PtpB, estão corroborando com os resultados experimentais descritos por Thanh e colaboradores. (N.D. Thanh et al., 2019).

5.3 Estudos por Dinâmica Molecular

Para complementar o estudo de ancoramento molecular, foi avaliado o comportamento dinâmico de um composto derivado da pirimidina que obteve resultado intermediário (inibidor 5), em relação a sua conformação diante a enzima e suas energias de interações quando comparado aos outros compostos, a fim de entender melhor como o composto em questão se comporta, quando submetido a condições dinâmicas, diferente do ancoramento que é estático.

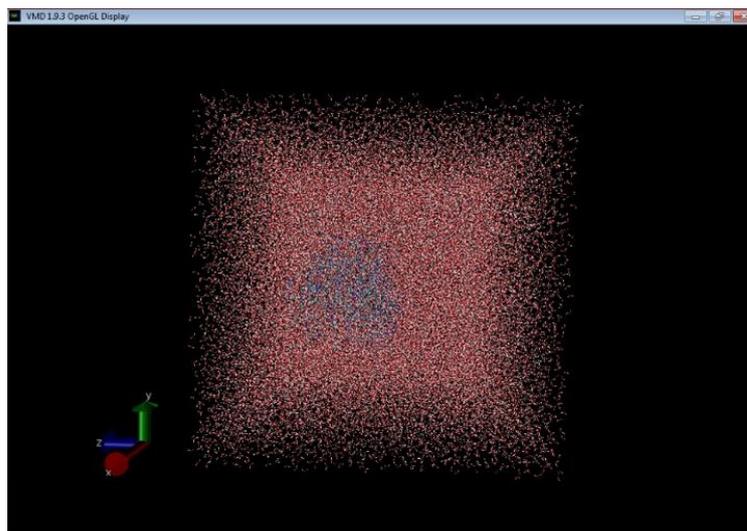
Para o sistema em questão, foi utilizado uma caixa de simulação que continha o complexo e as moléculas de água. As simulações foram realizadas a temperatura de 300K.

O composto foi submetido a etapas de otimização do sistema e simulações por DM de 20ns, como descrito na seção de metodologia, com o propósito de verificar a estabilidade do sistema enzima-ligante. Com os resultados obtidos através das simulações por DM, foi possível verificar se o sistema se manteve dentro da caixa de solvatação, além de gerar e analisar gráficos das variações de energia, temperatura, desvio da raiz média quadrática e número de ligações de hidrogênio formadas durante o tempo de simulação.

5.4 Análise do Sistema na Caixa de Solvatação

Foi possível observar que o sistema estudado permaneceu dentro da caixa de solvatação após analisar o arquivo posterior a adição de solvente no sistema (arquivo solv.gro) e também após a simulação de dinâmica molecular com o arquivo md.gro para cada instante de tempo, onde o complexo permaneceu dentro da caixa.

Figura 5.6 – Análise da caixa de solvatação utilizando o programa VMD.

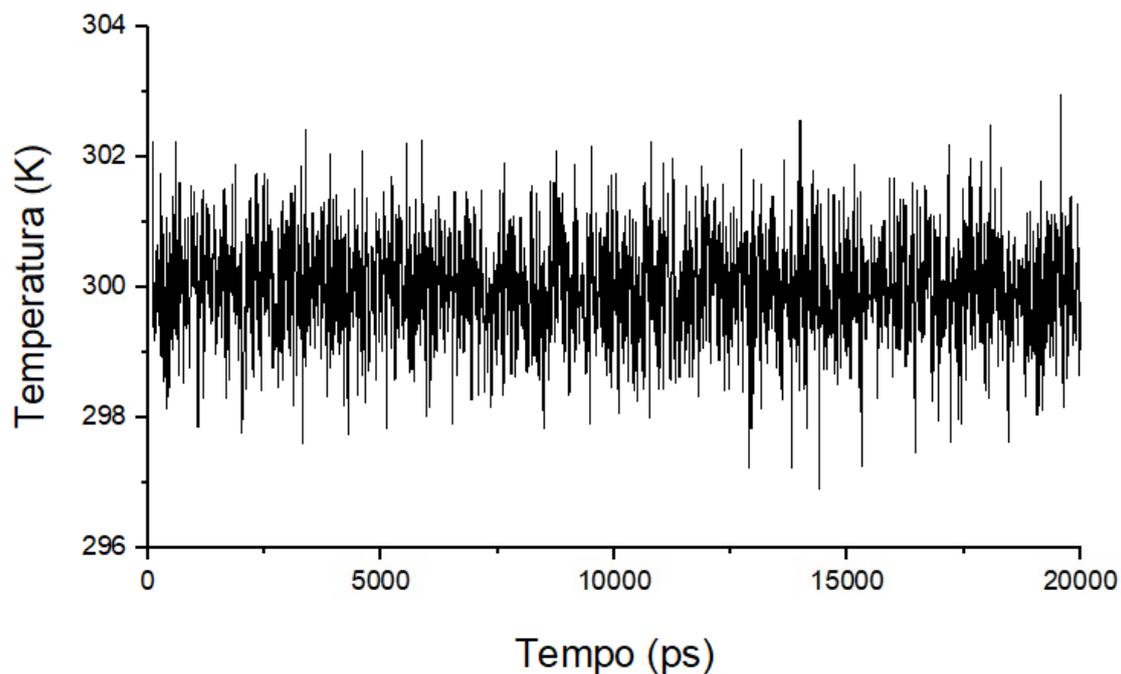


Fonte: autor.

5.5 Análise da Temperatura

Para confirmar que a temperatura não variou ao longo da simulação por DM foi gerada um gráfico da temperatura pelo tempo simulado, podendo observar que o sistema permaneceu na temperatura de 300K, variando pouco de 298 a 302. A figura 5.7 apresenta o gráfico com a variação de temperatura.

Figura 5.7 – Variação de temperatura ao longo da simulação por DM

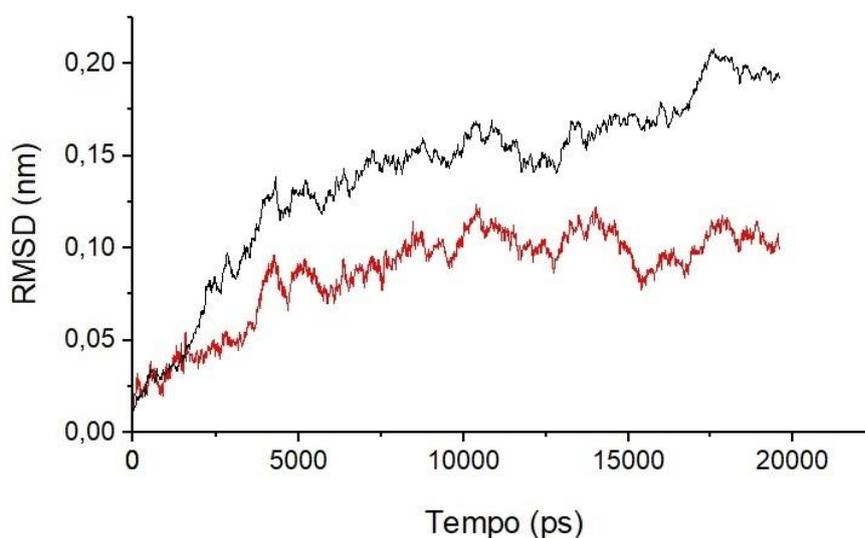


Fonte: autor.

5.6 Análise dos Gráficos de Desvio Padrão

Através da análise do desvio da raiz média quadrática (DRMQ) foi possível avaliar as diversas conformações espaciais assumidas pelo sistema ao longo do tempo em relação à estrutura média deste conjunto. Esse parâmetro pode dar uma ideia do quanto a estrutura tridimensional flutuou ao longo do tempo, bem como permite a observação de flutuações locais, como, por exemplo, quais os resíduos com maior mobilidade durante uma dinâmica, para o caso de proteínas. O DRMQ foi obtido para o inibidor 5 e para a enzima. A figura 5.8 apresenta o gráfico de DRMQ temporal para o sistema analisado.

Figura 5.8 – Variação DRMQ temporal para a simulação enzima/inibidor. Sendo a curva da enzima (preto) e o ligante (vermelho).



Fonte: autor.

Como o sistema não apresentou valores de desvios elevados, contendo valores abaixo de 0,21 nm, significa uma estabilidade nas posições atômicas ao longo da simulação, já que valores elevados de DRMQ indicam uma maior variação das posições dos átomos.

Como se pode observar no gráfico, o DRMQ temporal tende a estabilizar após 5000 ps de simulação, não passando de 0,125 nm para o ligante e, de 0,21 nm para a proteína. Esses resultados sugerem uma interação satisfatória entre o inibidor e a enzima, indicando que o inibidor se acomoda bem nas cavidades do sítio ativo durante o período simulado, apresentando estabilização do sistema.

Outro ponto é que o ligante não apresentou valores maiores que a enzima, outro indicativo que o sistema tende a estabilidade e o ligante se acomoda de uma maneira geral bem nas cavidades do sítio ativo.

Na tabela 5.4, são exibidos os resultados para a média, máximo valor e desvio padrão do DRMQ temporal. Para o sistema, a média de DRMQ temporal para o ligante foi de 0,087 nm e para a proteína de 0,139 nm, indicando estabilidade dinâmica da simulação, pois a média da variação das posições dos átomos não obteve valores altos.

Tabela 5.4 – Média do DRMQ temporal e desvio médio ao longo do sistema simulado.

Sistema	Média (nm/A)	Máximo (nm/A)	Desvio padrão
Proteína	0,139	0,208	0,046
Inibidor	0,087	0,124	0,025

Fonte: autor.

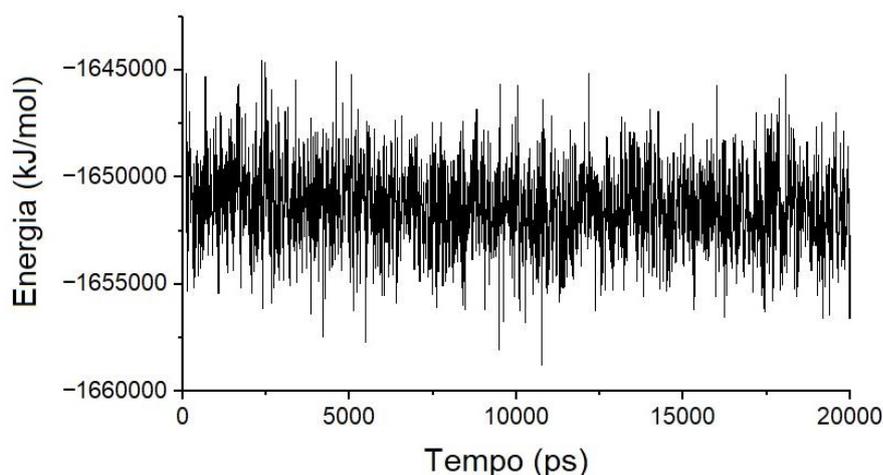
O desvio máximo não ultrapassou 0,208 nm para a proteína e 0,124 nm para o inibidor, outro indicador que não teve desvios significativos na DRMQ, podendo confirmar a estabilidade tanto para o desvio máximo, como o desvio padrão.

5.7 Variação de Energia

A figura 5.9 apresenta o gráfico de variação de energia total para o sistema estudado. No gráfico pode-se observar a estabilidade do sistema desde os primeiros ps de simulação. Onde o valor médio para a energia total foi de $-1651370 \text{ kJmol}^{-1}$.

A Energia total negativa indica que o sistema está em um estado energeticamente favorável e estável, onde as interações entre as partículas do sistema são atrativas e estão contribuindo para a estabilidade do sistema, além do valor baixo de energia total ser um outro indicativo para sua estabilidade.

Figura 5.9 – Variação de energia total do sistema formado pelo ligante e a enzima durante o tempo de 20 ns realizada na simulação por DM.



Fonte: autor.

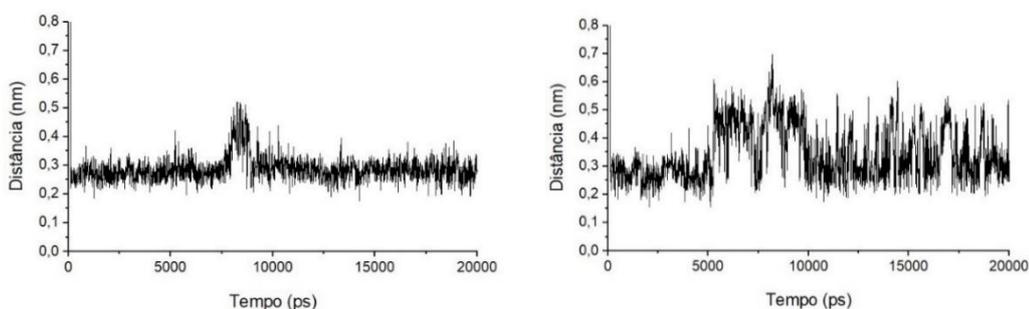
5.8 Interação do Ligante com Resíduos do Sítio Ativo da Enzima

Foi realizado o estudo do comportamento dinâmico do inibidor 5 dentro do sítio ativo da enzima, a fim de analisar quais resíduos que contribuem para a permanência do inibidor na enzima devido as ligações de hidrogênio formadas entre os resíduos e o inibidor. Para verificar as ligações formadas, foi utilizado o programa VMD, identificando quais resíduos permaneceram próximo ao inibidor durante toda a simulação de DM. Nas figuras 5.10, 5.11, 5.12, 5.13, 5.14, 5.15, 5.16, 5.17 e 5.18 estão apresentados os gráficos da distância desses resíduos com o inibidor, em relação ao tempo de simulação por DM.

Durante toda a dinâmica foi possível observar que o inibidor permaneceu entre os resíduos Arg166, Arg59, Arg63, Ala162, His94, Cys160, Lys164, Ser57, Tyr125. Dentre os resíduos citados anteriormente, somente a Ala162 e Glu60, de acordo com o estudo por ancoramento molecular, não realizam ligação de hidrogênio com o inibidor. Porém, durante o estudo de dinâmica molecular, foi possível observar que estes resíduos podem ter contribuído para a permanência deste inibidor no interior do sítio ativo.

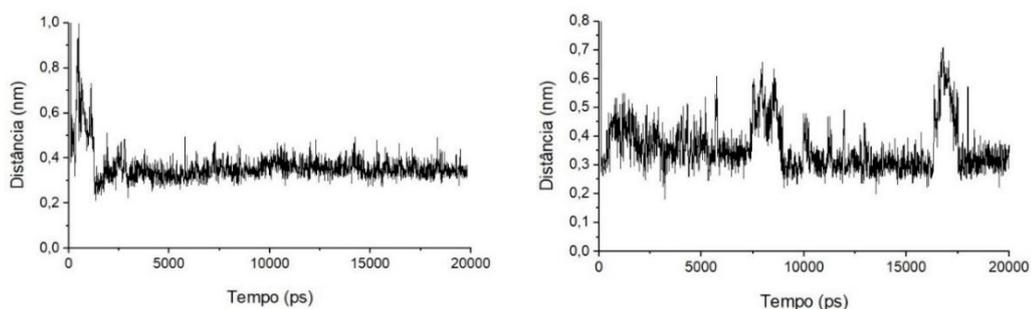
Ao longo da dinâmica, o resíduo Arg166 se estabilizou em 0,3 nm nos primeiros segundos de simulação, havendo um pico aos 7500 ps, porém volta a estabilizar após os 10000 ps; o resíduo Arg59 se estabilizou entre 0,2 e 0,4 nm; o resíduo Arg63 começou em uma distância de 1 nm, logo depois ele se estabilizou com pouca variação de distância em 0,3 nm; o resíduo Cys160 teve alguns picos de variação de distância, porém pode-se dizer que estabilizou entre 0,3 e 0,5 nm; o resíduo Lys164 se estabilizou entre 0,4 e 0,5 nm; o resíduo Ser57 estabilizou entre 0,45 e 0,55 nm; o resíduo Glu60 se estabilizou em 0,25 nm; o resíduo Ala162 se estabilizou entre 0,2 e 0,3 nm e o resíduo Tyr125 se estabilizou entre 0,2 e 0,4 nm.

Figura 5.10 e 5.11 – Variação da distância entre o inibidor e os resíduos Arg166 (à esquerda) e Arg59 (à direita) durante 20 ns de simulação por DM.



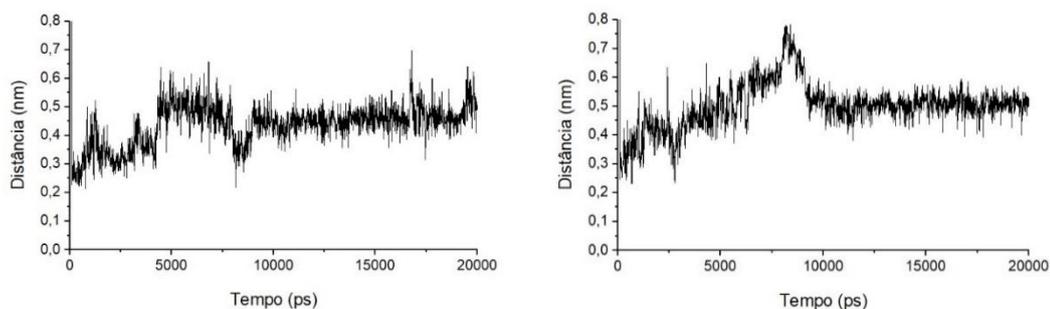
Fonte: autor.

Figura 5.12 e 5.13 – Variação da distância entre o inibidor e os resíduos Arg63 (à esquerda) e Cys160 (à direita) durante 20 ns de simulação por DM.



Fonte: autor.

Figura 5.14 e 5.15 – Variação da distância entre o inibidor e os resíduos Lys164 (à esquerda) e Ser57 (à direita) durante 20 ns de simulação por DM.



Fonte: autor.

Figura 5.16 e 5.17 – Variação da distância entre o inibidor e os resíduos Glu60 (à esquerda) e Ala162 (à direita) durante 20 ns de simulação por DM.

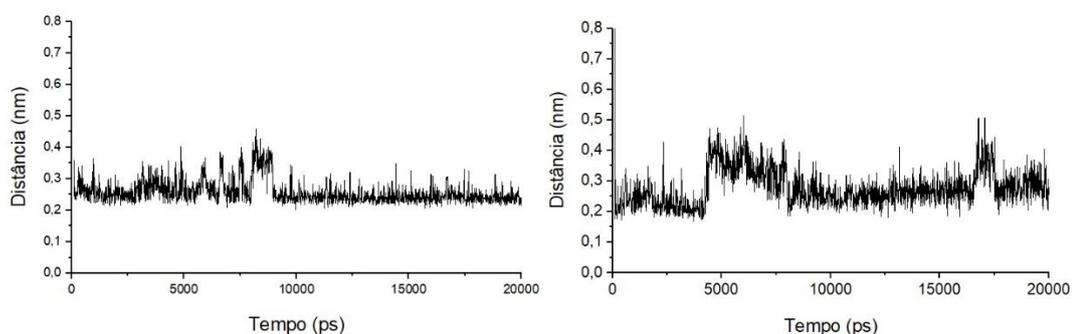
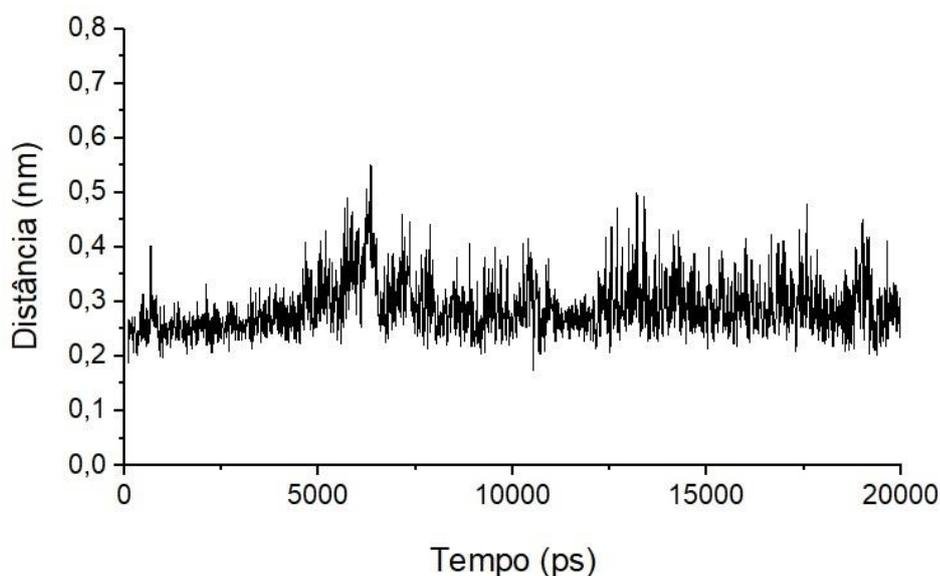


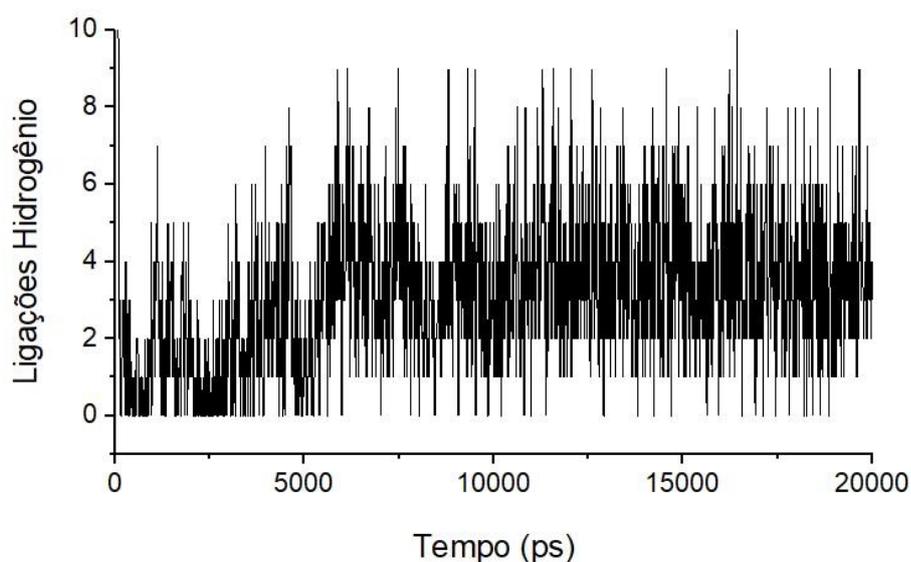
Figura 5.18 – Variação da distância entre o inibidor e o resíduo Tyr 125 durante 20 ns de simulação por DM.



Fonte: autor.

De acordo com a técnica de ancoramento molecular, foi possível observar que o inibidor realizou ligações de hidrogênio com 7 resíduos de aminoácidos. Na dinâmica este inibidor chegou a formar ligações de hidrogênio com 9 resíduos após os 5000 ps de simulação, dois a mais que o ancoramento molecular. Essas ligações se mostraram importantes para estabilização do composto no sítio ativo. A figura 5.19 apresenta o gráfico do número de ligações de hidrogênio do inibidor com a enzima.

Figura 5.19 – Número médio de ligações de hidrogênio formado entre o inibidor e a enzima.



Fonte: autor.

6 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos demonstraram que a proteína PtPb pode ser um alvo eficaz no tratamento da tuberculose, e os inibidores derivados da pirimidina estudados neste trabalho mostraram-se promissores para bloquear a atividade dessa enzima. De acordo com os resultados teóricos de ancoramento molecular, foi possível constatar que alguns destes compostos possuem uma boa interação no sítio ativo da enzima. Os resultados obtidos foram satisfatórios em questão das energias de interação intermolecular e as conformações (orientação e sobreposição) dos compostos derivados pirimidina em relação a PtpB da *M. Tuberculosis*, revelando uma correlação direta entre os resultados teóricos de capacidade inibitória com os experimentais de energia de interação intermolecular.

Dentre os compostos inibidores analisados, o inibidor 11 foi considerado como o mais promissor para ser desenvolvido como um potencial inibidor da enzima PtPb. Isso se deve ao fato que o inibidor 11 apresentou uma interação intermolecular com valor de energia mais baixo em comparação com os outros inibidores e os substratos naturais. Além disso, o inibidor 11 demonstrou maior estabilidade no sítio ativo da enzima, juntamente com valores menores de energia de ligação de hidrogênio total e constante de inibição em comparação aos demais inibidores investigados neste estudo.

Os resultados obtidos pelas simulações por dinâmica molecular do inibidor 5 no sítio ativo da PtPb confirmou os resultados obtidos do ancoramento molecular, mostrando que este inibidor permanece bem ancorado dentro do sítio ativo durante o tempo simulado no sistema, e a presença dos aminoácidos Arg166, Arg59, Arg63, Cys160, Lys164, Ser57, Tyr 125, Glu60 e Ala162 são importantes para a estabilidade deste inibidor no sítio ativo da PtPb. Sendo possível observar a proximidade e a permanência desses resíduos que realizaram ligações com o inibidor, reforçando os resultados sugeridos pela técnica de ancoramento molecular.

Os resultados de DRMQ reforçam a estabilidade do inibidor na enzima devido os valores da proteína serem superior ao do inibidor, além da estabilização da temperatura e valor da energia total do sistema. Onde todos os resultados indicam que o inibidor e a enzima tiveram boa relação diante aos parâmetros e simulações impostas.

Os cálculos de energia de ancoramento molecular, aliado às simulações por dinâmica molecular, sugerem que os compostos derivados da pirimidina são promissores para o planejamento de potenciais inibidores para a PtPb da *M. Tuberculosis*, uma vez que a sobrevivência da bactéria está relacionada com a proteína em questão.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BIALY L. et al. **Inhibitors of protein tyrosine phosphatases: next-generation drugs?** 2005
- BLEVINS, S. M.; BRONZE, M. S.; KOCH, R. Steve M. Blevins, Michael S. Bronze, Robert Koch and the 'golden age' of bacteriology. 2010.
- BORGDORFF, M. W.; FLOYD, K.; BROEKMANS, J. F. **Interventions to reduce tuberculosis mortality and transmission in low and middle-income countries.** Bulletin of the World Health Organization, 2002.
- BUCHMEIER, N. et al. **A parallel intraphagosomal survival strategy shared by Mycobacterium tuberculosis and Salmonella enterica.** Mol Microbiol, v. 35, p. 1375-1382, 2000.
- BUSATTO, C. et al. **Tuberculose ativa versus Tuberculose Latente: uma revisão de literatura.** Journal Infection Control, Rio Grande do Sul, 4(3), 60-4. 2015
- CHIARADIA, L. D. et al. **Synthesis, biological evaluation and molecular modeling of chalcone derivatives as potent inhibitors of Mycobacterium tuberculosis protein tyrosine phosphatases (PtpA and PtpB).** J. Med. Chem., 2012, 55, 390-402
- CONDE, M. B. et al. **III Brazilian Thoracic Association Guidelines on Tuberculosis.** J Bras Pneumol, 2009.
- EDWARDS, P. M. **Origin 7.0:** scientific graphing and data analysis software. Journal of Chemical Information and Computer Sciences, Washington, v. 42, n. 5, p. 1270-1271, Sept./Oct. 2002.
- FERRI et al. **Diagnóstico da tuberculose: uma revisão.** Revista Liberato. Novo Hamburgo, v.15, n.24, p. 105-212. 2014
- HUANG, S. Y. e ZOU, X. **Advances and Challenges in Protein-Ligand Docking.** International Journal of Molecular Sciences. v. 11, n. 7, p. 3016-3034, 2010.
- HUMPHREY, W.; DALKE, A.; SCHULTEN, K. **VMD:** Visual molecular dynamics. Journal of Molecular Graphics, v. 14, n. 1, p. 33–38, 1996.
- JOHNSTON et al., **Treatment outcomes of multidrug-resistant tuberculosis,** 2009
- JOSA, D.; CUNHA, E. F. F.; RAMALHO, T. C.; CAETANO, M. S.; SOUZA, T. C. S. **Homology modeling of wild-type, D516V and H526L Mycobacterium Tuberculosis RNA polymerase and their molecular docking study with inhibitors.** Journal of Biomolecular Structure and Dynamics, Easton, v. 25, n. 4, p. 373-376, Feb. 2008.

KHAN, M. T. H.; FUSKEVAG, O.; SYLTE, I. Discovery of potent thermolysin inhibitors using structure based virtual screening and binding assays. *Journal of Medicinal Chemistry*, Washington, v. 52, n. 1, p. 48-61, 2009.

KITCHEN, D.B.; DECORNEZ, H.; FURR, J.R.; BAJORATH, J. Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: methods and applications. *Nat. Rev. Drug Discov.* 3, 935–949, 2004.

LEITE, M. F.; LIMA, L. H.; GUIDO, R. V. C. **O papel da química computacional no desenvolvimento de novos compostos terapêuticos: um estudo de caso com a proteína tirosina fosfatase B da *Mycobacterium tuberculosis*.** *Química Nova*, v. 42, n. 9, p. 1033-1045, 2019.

LIMA, T. M.; BELOTTI, N. C. U.; NARDI, S. M. T.; PEDRO, H. S. P. **Teste rápido molecular GeneXpert MTB/RIF para diagnóstico da tuberculose.** *Rev Pan-Amaz Saúde*, v. 8, n. 2, p. 65-76, 2017.

LOPES, R. M.; PIETRO, R. C. L. R. **Ancoragem molecular na predição da interação fármaco-proteína: avanços e desafios.** *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 27, n. 1, p. 115-126, 2017.

MASCARELLO A. et al. ***Mycobacterium tuberculosis*-secreted tyrosine phosphatases as targets against tuberculosis: exploring natural sources in searching for new drugs.** 2016

NAIR, P. C.; MINERS, J. O. **Molecular dynamics simulations: from structure function relationships to drug discovery.** *In silico pharmacology*, v. 2, n. 1, p. 4, 2014.

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

NIKAIDO, H. **Prevention of drug access to bacterial targets: Permeability barriers and active efflux,** 1994.

PAL, R.; BISHT, M. K.; MUKHOPADHYAY, S. **Secretory Proteins of *Mycobacterium Tuberculosis* and Their Roles in Modulation of Host Immune Responses: Focus on Therapeutic Targets.** *FEBS J.*, v. 289, p. 4146-4171, 2022.

PELCZAR, M. J. Jr.; CHAN, E. C. S; KRIEG, N. R. **Microbiologia – conceitos e aplicações.** Tradução: Sueli F. Yamada et al. 2.ed. São Paulo: Makron Books, 1996. 2 v.

ROSENDO, L. D. S. L.; BEZERRA, C. W. F.; DE LIMA, M. M. **Aspectos epidemiológicos da *Mycobacterium tuberculosis*: uma revisão.** *Meio Ambiente (Brasil)*, 2020.

BAGCCHI, S. **WHO's Global Tuberculosis Report 2022.** *The Lancet Microbe*, vol. 4, no. 1, p. e20, 2023.

SALMASO, V.; STEFANO, M. Bridging Molecular Docking to Molecular Dynamics in Exploring Ligand-Protein Recognition Process: An Overview. *Frontiers in Pharmacology*, p. 923. DOI: 10.3389/fphar, 2018.

SANTOS, D. M.; ARAÚJO, V. H. S.; ARAÚJO, R. M. **Papel da Química Computacional na seleção e otimização de compostos promissores para o desenvolvimento de fármacos.** *Revista Virtual de Química*, v. 12, n. 2, p. 359-374, 2020.

SATHISHA, K.; GOPALA, S.; RANGAPPA, K. S. **Biological activities of synthetic pyrimidine derivatives.** *World J. Pharmaceut Res*, v. 15, n. 2, p. 1467-1491, 2016. SPOEL, D. van der et al. GROMACS user manual version 3.0. Groningen: University of Groningen, 2001. Disponível em: <<http://www.gromacs.org>>.

STEELE, J. H. et al. **Regional and Country Status Reports.** Part 2. *Mycobacterium bovis* infection in animals and humans. Ed. Thoen CO, Steele JH. Ames (IA): Iowa State University Press; 1995. p. 167-345.

THANH, N.D. et al. **Synthesis, biological evaluation and molecular modeling studies of 1,2,3-1H-triazoles having 4H-pyrano[2,3-d] pyrimidine as potencial M. Tuberculosis;** Received 23 October 2018; Accepted 4 December 2019.

THOEN, C. O.; STEELE, J. H. (Eds.). **Regional and Country Status Reports.** Part 2. *Mycobacterium bovis* infection in animals and humans. Ames (IA): Iowa State University Press, 1995. p. 167-345.

THOMSEN, R.; CHRISTENSEN, M. H. MolDock: a new technique for high-accuracy molecular docking. *Journal of Medicinal Chemistry*, Washington, v. 49, n. 11, p. 3315-3332, June 2006.

VIEGAS JR, C.; BOLZANI, V. S.; BARREIRO, E. J. **Os produtos naturais e a química medicinal moderna.** *Química Nova*, v.29, n.2, p.326-37, 2006.

APÊNDICE – PROGRAMAS DO PACOTE GROMACS 4.0

1. ARQUIVOS DE ENTRADA

Após obtenção do arquivo do ligante com o formato pdb, obtido após a etapa de parametrização é necessário converter o arquivo .pdb para .gro com o seguinte comando:

```
gmx editconf -f ligante.pdb -o ligante.gro
```

O arquivo da proteína obtido do banco de dados PDB no formato .pdb é utilizado para geração de arquivos de coordenadas(.gro) e topologia(.top), seguido da escolha do campo de força utilizado (GROMOS96 53a6) com o seguinte comando:

```
gmx pdb2gmx -f enzima.pdb -o enzima.gro -p enzima.top - water spc -igh
```

Em seguida é necessário acrescentar as coordenadas do ligante no arquivo da proteína, modificando o arquivo enzima.gro com o acréscimo das coordenadas do arquivo ligante.gro, além de alterar o número total de átomos final. Obtendo assim os arquivos de entrada .gro e .top da enzima e do ligante.

2. CONSTRUÇÃO DA CAIXA DE SOLVATAÇÃO E ADIÇÃO DO SOLVENTE (ÁGUA)

Para definir a caixa de solvatação e posterior adição de solvente no sistema foi utilizado os seguintes comandos:

```
gmx editconf -bt cubic -f enzima.gro -o caixa.gro -c -d 1.0
```

```
gmx solvate -cp caixa.gro -cs spc216.gro -p enzima.top -o solv.gro
```

Após a criação da caixa de solvatação é necessário verificar o arquivo solv.gro no programa VMD e conferir se o ligante está correto dentro da caixa, além de verificar o arquivo enzima.top se foi incluso o solvente.

3. MINIMIZAÇÃO DE ENERGIA E DINÂMICA MOLECULAR

Para a execução da minimização de energia e posterior equilibração e dinâmica molecular é necessário gerar arquivos de input corrigido com seus parâmetros como tempo de simulação, temperatura, pressão, entre outros parâmetros. Utilizando os seguintes comandos para cada etapa:

-Minimização de energia:

```
gmx grompp -f em.mdp -c solv.gro -p enzima.top -o em.tpr
```

```
gmx mdrun -v -deffnm em
```

-Equilibração:

```
gmx make_ndx -f em.gro -o index.ndx
```

-Equilibração NVT:

```
gmx grompp -f nvt.mdp -c em.gro -p enzima.top -n index.ndx -o nvt.tpr
```

```
gmx mdrun -deffnm nvt
```

-Equilibração NPT:

```
gmx grompp -f npt.mdp -c nvt.gro -t nvt.cpt -p enzima.top -n index.ndx -o npt.tpr
```

```
gmx mdrun -deffnm npt
```

tail -f npt.job& (Para acompanhar o andamento do cálculo)

Simulação de dinâmica

```
gmx grompp -f md.mdp -c npt.gro -t npt.cpt -p enzima.top -n index.ndx -o md.tpr
```

```
gmx mdrun -deffnm md
```

Após obtido os arquivos de dinâmica molecular é possível gerar e analisar os arquivos obtidos.

4. Análise de resultados

Para gerar os gráficos e posterior análise são utilizados os seguintes comandos:

-Gráfico de variação de energia total

```
gmx energy -f md.edr -o energia_total.svg
```

-Gráfico de variação de temperatura

```
gmx energy -f md.edr -o temperatura.svg
```

-Gráfico de variação de pressão

```
gmx energy -f md.edr -o pressão.svg
```

-Gráfico RMSD (Proteína)

```
gmx rms -n index.ndx -s md.tpr -f md.xtc -o RMSDtemp.svg
```

-Gráfico RMSD (Ligante)

```
gmx rms -n index.ndx -s md.tpr -f md.xtc -o RMSDtemp.svg
```

-Gráfico de número de ligações de hidrogênio

```
gmx hbond -n index.ndx -s md.tpr -f md.xtc -num NumeroLigaçõesHidrogênio.svg
```

-Gráfico de distâncias interatômicas

```
gmx make_ndx -f md.tpr
```

```
gmx pairdist -f md.xtc -s md.tpr -n index.ndx -o distancia.svg
```