



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
CURSO DE GRADUAÇÃO EM QUÍMICA - BACHARELADO

ESTUDOS *IN SILICO* PARA IDENTIFICAÇÃO DE ALVOS MOLECULARES PARA
QUINOLINAS COM POTENCIAL ATIVIDADE ANTILEISHMANIOSE

Marília Cecília da Silva

João Pessoa

2024

Marília Cecília da Silva

ESTUDOS *IN SILICO* PARA IDENTIFICAÇÃO DE ALVOS MOLECULARES PARA
QUINOLINAS COM POTENCIAL ATIVIDADE ANTILEISHMANIOSE

Trabalho de Conclusão de Curso, requisito parcial
para obtenção do grau de Bacharelado em
Química, submetido ao Curso de Graduação em
Química – Bacharelado, da Universidade Federal
da Paraíba.

Orientadora: Prof^ª. Dr.^ª Karen Cacilda Weber

João Pessoa

2024

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

S586e Silva, Marília Cecília da.

Estudos in silico para identificação de alvos moleculares para quinolinas com potencial atividade antileishmaniose / Marília Cecília da Silva. - João Pessoa, 2024.

52 p. : il.

Orientação: Karen Cacilda Weber.

TCC (Curso de Bacharelado em Química) - UFPB/CCEN.

1. Target Fishing. 2. Docking receptor-ligante. 3. Planejamento de fármacos. 4. Dinâmica Molecular. I. Weber, Karen Cacilda. II. Título.

UFPB/CCEN

CDU 54(043.2)



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA
COORDENAÇÃO DOS CURSOS DE GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

ATA DE DEFESA DE TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

Ata da sessão de defesa de Trabalho de Conclusão de Curso para obtenção do grau de BACHAREL em Química do(a) discente MARÍLIA CECÍLIA DA SILVA,

matrícula nº 20200095370, realizada aos 23 (vinete e três) dias do mês de OUTUBRO de 2024, às 14 h 30 min. Reuniram-se no(a) AUDITÓRIO DO LACOM, UFPB, Campus I, João Pessoa, os membros da Banca Examinadora composta pelos(as) professores(as) GERD BRUNO DA ROCHA, MARCUS TULLIUS SCOTTI

(examinadores) e KAREN CACILDA WEBER (presidente/orientador(a)), com o objetivo de proceder à avaliação do Trabalho de Conclusão de Curso de intitulado "ESTUDOS IN SILICO PARA IDENTIFICAÇÃO DE ALVOS MOLECULARES PARA QUINOLINAS COM POTENCIAL ATIVIDADE ANTI-LEISHMANI- OSE."

. Após a apresentação do trabalho pelo(a) discente e a arguição pela banca examinadora, os membros reuniram-se para deliberar sobre a nota a ser atribuída ao referido Trabalho de Conclusão de Curso. O(A) presidente da sessão, Prof.(a) KAREN CACILDA WEBER, comunicou ao aluno(a) e demais presentes que, por decisão da Banca, foi atribuída ao Trabalho de Conclusão de Curso a nota 9,9 (nove vírgula nove). Nada mais havendo a tratar, lavrou-se a presente ata que vai assinada pelos membros da Banca. João Pessoa, 23 de OUTUBRO de 2024.

Karen Weber

Orientador(a) Gerd Bruno da Rocha

Examinador(a) 1 [Assinatura]

Examinador(a) 2

Dedico aos meus pais, Vilmar e Julinha, agradeço por serem percurso.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Vilmar e Julinha, obrigada por sonharem os meus sonhos junto comigo. Aos meus irmãos, amigos próximos e familiares queridos, que torceram por mim nesta etapa da minha formação, assim como em tantas outras que se passaram e nas que ainda virão, sou muito grata por tê-los presentes.

Aos amigos feitos nessa trajetória, a começar pelos amigos da Física: Luiz, Karol, Lívia, Nando, Kadu e João. Guardo na memória os dias (e as boas risadas) que vivi com vocês. Aos meus amigos da Química, em especial: Jéssica, Lilyan, Rodrigo, Lucas e Isaque. Vocês, certamente, foram a melhor parte de ter mudado de (per)curso. À Rhayane, minha parceira de surtos e choros no LQQC, sou muito grata por tudo que compartilhamos. À Maria, agradeço pela amizade sincera, compartilhar meus dias com você neste último ano foi muito significativo para mim.

À minha orientadora, a Professora Dr.^a Karen C. Weber, pelas oportunidades e pela confiança depositadas. Obrigada por acreditar em mim e por me mostrar que posso alcançar voos mais altos. Aos meus padrinhos científicos, os pesquisadores Dr. Elton Chaves e Dr.^a Jéssika Viana, por tudo o que compartilharam e me ensinaram. A pesquisadora que sou hoje devo muito a vocês três.

Ao LQQC (Laboratório de Química Computacional), agradeço pela grande oportunidade de ter sido aluna deste ambiente de aprendizado. À Universidade Federal da Paraíba, e especialmente aos professores do CCEN, sou grata pela formação recebida. Ao LASOM (Laboratório de Síntese Orgânica Medicinal da Paraíba), em especial ao Professor Dr. Claudio Gabriel, pela colaboração.

Ao CNPq, pelas bolsas de Iniciação Científicas concedidas.

Ao CENAPAD SP (Centro Nacional de Processamento de Alto Desempenho em São Paulo) pelo ambiente computacional.

À FAPESQ-PB (Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado da Paraíba).

À CAPES.

RESUMO

A leishmaniose é uma doença tropical negligenciada, sendo a forma visceral a mais severa. Derivados quinolínicos têm demonstrado potencial terapêutico em uma série de doenças, incluindo a leishmaniose, especialmente causadas pelas espécies *Leishmania donovani* e *Leishmania infantum*. A identificação do mecanismo de ação para esses compostos é de fundamental interesse no planejamento racional de fármacos, que inclui estudos computacionais baseados na estrutura de receptores biológicos. Simulações computacionais têm sido amplamente utilizadas na identificação de alvos moleculares, considerando o elevado custo dos métodos convencionais empregados para esse propósito. Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo identificar o provável mecanismo de ação dos derivados quinolínicos, com o foco em *L. donovani*, e avaliar as interações moleculares presentes na formação do complexo por meio de simulações computacionais. Este estudo utilizou a abordagem de *Target Fishing* na identificação de um potencial alvo biológico para um conjunto de derivados quinolínicos com potencial atividade leishmanicida. Com base nas estruturas tridimensionais dos alvos moleculares obtidos pelo *docking* inverso, modelos farmacofóricos foram construídos com o intuito de examinar as principais regiões de interação ligante-receptor utilizando o programa GOLD. Os modelos que descreveram melhor os modos de interação junto ao composto mais promissor indicado pelos estudos de *docking* serviram como estrutura de partida para simulações de Dinâmica Molecular (DM). Uma parte dos alvos com melhor pontuação no *docking* foi específica para *L. major*, destacando-se a enzima N-miristoiltransferase (NMT) como o principal alvo para essa espécie. O modelo baseado na estrutura de código PDB 2WSA apresentou o melhor perfil preditivo em termos estatísticos. A partir dos resultados do *docking*, o composto 1G foi considerado o derivado quinolínico mais promissor. As simulações de DM mostraram que o ligante mais promissor apresentou um RMSD menor que 2 Å, o que demonstra uma boa estabilidade do complexo formado. Este composto exibiu um perfil farmacodinâmico promissor, com alta afinidade por ambas as enzimas, o que aponta o composto 1G como um potencial inibidor da NMT. Os resultados sugerem que a interação com a *LdNMT* pode ser um mecanismo de ação relevante para o conjunto de quinolinas estudadas.

Palavras-chave: *Target Fishing*; *docking* receptor-ligante; planejamentos de fármacos; dinâmica molecular.

ABSTRACT

Leishmaniasis is a neglected tropical disease, the most severe form of which is visceral. Quinoline derivatives have shown therapeutic potential in a number of diseases, including leishmaniasis, especially caused by the species *Leishmania donovani* and *Leishmania infantum*. Identifying the mechanism of action for these compounds is of fundamental interest in rational drug design, which includes computational studies based on the structure of biological receptors. Computational simulations have been widely used to identify molecular targets, given the high cost of conventional methods used for this purpose. In this context, the aim of this study was to identify the probable mechanism of action of quinoline derivatives, with a focus on *L. donovani*, and to evaluate the molecular interactions present in the formation of the complex by means of the computational simulations. Target Fishing approach was used in this study to identify a potential biological target for a set of quinoline derivatives with potential leishmanicidal activity. Based on the three-dimensional structures of the molecular targets obtained by inverse docking, pharmacophore models were built in order to investigate the main areas of ligand-receptor interaction using the GOLD programme. The models that best described the modes of interaction with the most promising compound determined by the docking studies were used as a starting structure for Molecular Dynamics (MD) simulations. Part of the targets with the best docking scores were specific to *L. major*, with the N-myristoyltransferase (NMT) enzyme standing out as the main target for this species. Model based on the PDB 2WSA code structure provided the best results in statistical terms. DM simulations demonstrated that the most promising ligand presented an RMSD of under 2 Å, which demonstrates the good stability of the complex formed. This compound exhibited a promising pharmacodynamic profile, with high affinity for both enzymes, which suggests that compound 1G is a promising NMT inhibitor. The results indicate that interaction with *Ld*NMT may be a relevant mechanism of action for the set of quinolines investigated.

Keywords: Target Fishing; receptor-ligand docking; drug design; molecular dynamics.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Fluxograma da metodologia abordada nesse trabalho.

Figura 2 – Estrutura dos compostos quinolínicos.

Figura 3 – Identidade da sequência de aminoácidos das enzimas *Lm*NMT.

Figura 4 – Principais interações para as enzimas de *Lm*NMT.

Figura 5 – Pontos farmacofóricos de cada ligante PDB.

Figura 6 – Curva *ROC* de cada modelo.

Figura 7 – Sobreposição da melhor pose do *docking* do ligante cristalográfico (verde) e o composto 1G (magenta).

Figura 8 – Principais interações da pose docada do composto 1G na enzima *Ld*NMT.

Figura 9 – Gráficos dos RMSDs da *Lm*NMT complexada com os compostos a) DDD646 e b) 1G.

Figura 10 – Gráficos dos RMSFs da *Lm*NMT complexada com os compostos a) DDD646 e b) 1G.

Figura 11 – Sobreposição das conformações mais representativas dos compostos DDD646 (verde) e 1G (magenta).

Figura 12 – Principais interações da pose docada do composto a) DDD646 e b) 1G no cluster mais representativo da *Lm*NMT.

Figura 13 – Gráficos do a) RMSD e b) RMSF da *Ld*NMT complexada com o composto 1G.

Figura 14 – Principais interações da pose docada do composto 1G no cluster mais representativo da *Ld*NMT.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Moléculas obtidas do banco de dados do ChEMBL.

Tabela 2 – Alvos preditos pela triagem virtual inversa.

Tabela 3 – Tipo de interação realizada entre os resíduos e o ligante cristalográfico.

Tabela 4 – RMSDs da estrutura dos ligantes docados em comparação com a pose cristalográfica.

Tabela 5 – Análise em consenso pelo método *rank by number*.

Tabela 6 – Os clusters mais populosos com a melhor pose obtida do *docking*.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	11
2. OBJETIVOS.....	14
2.1 Objetivo geral.....	14
2.2 Objetivos específicos.....	14
3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	15
3.1 Identificação de alvos in silico.....	15
3.2 Busca farmacofórica.....	17
3.3 Docking receptor-ligante.....	19
3.4 Simulações de Dinâmica Molecular.....	22
3.5 Derivados quinolínicos como potenciais inibidores da N-miristoiltransferase.....	24
4. METODOLOGIA.....	26
4.1 Identificação de alvos moleculares por Target Fishing.....	26
4.2 Modelo farmacofórico baseado na estrutura do complexo receptor-ligante.....	28
4.3 Docking receptor-ligante.....	31
4.4 Simulações de Dinâmica Molecular.....	32
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	33
5.1 Identificação de alvos por Target Fishing.....	33
5.2 Validação do protocolo de docking molecular escolhido em enzimas de <i>Leishmania major</i>	35
5.2.1 Modelos farmacofóricos.....	36
5.2.2 Curva ROC.....	37
5.2.3 Docking molecular.....	39
5.3 Simulações de dinâmica molecular para as enzimas N-miristoiltransferase.....	42
6. CONCLUSÃO.....	47
Referências bibliográficas.....	48

1 INTRODUÇÃO

A leishmaniose é um conjunto de doenças de tripanossomas causadas por várias espécies do gênero *Leishmania*, de gravidade variável, representando um sério risco à saúde de milhões de pessoas em todo o mundo (HUSSAIN, H. et al., 2014). As leishmanioses são classificadas em três tipos clinicamente distintos: cutânea, mucocutânea e visceral. A forma mais severa desta doença é a Leishmaniose visceral (LV), também conhecida como calazar, e se apresenta como uma infecção visceral disseminada, afetando fígado, baço e medula óssea. É causada principalmente pelas espécies *Leishmania donovani* e *Leishmania infantum* (CARDOSO, E. et al., 2015).

Os principais fármacos utilizados no tratamento clínico da leishmaniose pertencem à classe dos antimoniais pentavalentes, como o antimoniato de meglumina, a anfotericina B e a miltefosina. No entanto, esses medicamentos causam efeitos colaterais graves, sendo tóxicos para os rins, fígado e pâncreas, podendo causar problemas cardíacos, gastrointestinais e apresentar potenciais danos teratogênicos. Além disso, uma alta resistência a esses medicamentos foi desenvolvida nos últimos anos pelos parasitas da *Leishmania*, dificultando o controle da doença com os agentes terapêuticos disponíveis. Esses fatores ressaltam a necessidade de pesquisas que ampliem o arsenal disponível para combater esta doença (ABONGOMERA, C. et al., 2018).

O uso de técnicas de simulação computacional tem desempenhado um papel relevante no desenvolvimento de novos medicamentos, podendo acelerar o processo de planejamento e otimização de moléculas candidatas a fármacos, bem como reduzir o tempo e os custos envolvidos neste processo. O impacto das estratégias de planejamento de fármacos baseadas na estrutura do receptor tem se intensificado nos últimos anos devido aos avanços significativos no desenvolvimento de arquiteturas computacionais mais rápidas e melhores algoritmos para computação de alto desempenho, além de trazer grandes benefícios para o setor farmacêutico (ROGNAN, D., 2017; DE VIVO, M. et al., 2016).

Na literatura foram identificados diversos potenciais alvos moleculares contra os parasitas *L. donovani* e *L. infantum*. Inclusive, com suas estruturas determinadas pelas técnicas de cristalografia de raios-X ou criomicroscopia eletrônica, o que permite a utilização de técnicas de simulações computacionais baseadas na estrutura do receptor. A partir de

estudos realizados para avaliar o potencial leishmanicida de moléculas sintéticas, a classe de derivados quinolínicos demonstrou-se bastante promissora.

Quinolinas são moléculas caracterizadas por sua diversidade estrutural e amplo espectro de atividades biológicas, sendo amplamente investigadas em inúmeros trabalhos na área de síntese orgânica (ZARGHI, A. et al., 2019). Essas moléculas e seus derivados constituem uma classe de compostos com relevante atividade farmacológica, presentes em diversos produtos naturais, podendo apresentar atividade antifúngica, antibacteriana, anticâncer, dentre outros (FOURNET, A. et al., 1996). Além disso, estudos demonstram que esses compostos possuem atividade antileishmania, como a sitamaquina, uma quinolina trissubstituída que avançou para a fase 2 de ensaios clínicos no tratamento da LV (GOPINATH, V. S., 2013; NAKAYAMA, H. et al., 2007).

No entanto, a literatura referente a estudos baseados na estrutura do receptor para alvos de *Leishmania* e, especificamente para estes compostos, se encontra em seu estágio inicial (A. REYNOLDS, K.; A. LOUGHLIN, W.; J. YOUNG, D., 2013). A maioria dos estudos que procuram identificar possíveis atividades biológicas para estes compostos consistem em abordagens por tentativa e erro. Além disso, as estratégias tradicionais para identificação de potenciais alvos biológicos demandam técnicas experimentais custosas e análises por métodos instrumentais mais sofisticados, o que dificulta sua utilização em larga escala (MAGALHÃES, C. S.; BARBOSA, H. J. C.; DARDENNE, L. E., 2007, p. 490). Dadas estas limitações, a identificação de alvos *in silico*, ou seja, utilizando métodos computacionais, é considerada uma alternativa promissora no contexto do planejamento de fármacos baseado na estrutura do receptor, podendo encontrar alvos biológicos que melhor interajam com os compostos de interesse. A compreensão das interações entre o ligante e o alvo auxilia no desenho de novos derivados com propriedades químicas melhoradas, com o objetivo de otimizar ainda mais o potencial terapêutico dessas moléculas (GALATI, S. et al., 2021).

Novos estudos para identificação de alvos biológicos com mais alta afinidade são necessários para realizar o desenvolvimento de fármacos com base na estrutura do receptor. Dada a urgência de medicamentos mais eficazes para combater esta doença, estudos *in silico* mostram-se de grande utilidade, uma vez que favorecem o desenvolvimento de estratégias mais eficazes, baseadas nos mecanismos moleculares e no entendimento da bioquímica relacionada ao efeito farmacológico desejado. O presente estudo visa, portanto, identificar os alvos moleculares mais promissores de *L. donovani*, contribuindo para o planejamento

racional de novas moléculas com potencial terapêutico superior. Essa abordagem oferece uma alternativa mais econômica e promissora para a descoberta de fármacos, com potencial impacto tanto no campo científico quanto na saúde pública.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Contribuir para o entendimento das interações moleculares entre um conjunto de quinolinas e alvos moleculares de *Leishmania donovani* por meio de simulações computacionais, visando o planejamento racional de novos fármacos antileishmaniose baseados na estrutura do receptor.

2.2 Objetivos específicos

- Identificar os alvos moleculares com maior afinidade pelas quinolinas sintetizadas pelo Laboratório de Síntese Orgânica e Medicinal da UFPB;
- Determinar os sítios de interação das quinolinas com as enzimas selecionadas;
- Analisar e comparar os modos de interação a fim de obter informações importantes sobre as características que determinam a atividade antileishmaniose dos compostos em estudo;
- Realizar simulações de *docking* ligante-receptor a fim de identificar ligantes com afinidades otimizadas;
- Realizar simulações de dinâmica molecular (DM) nos complexos ligante-receptor selecionados para capturar seu comportamento dinâmico e mudanças conformacionais;
- Analisar as trajetórias de DM para investigar as interações moleculares entre ligantes e receptor.

3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 Identificação de alvos *in silico*

Um alvo molecular, ou biológico, refere-se a uma macromolécula que atua como um mensageiro molecular, mediando um efeito biológico que se almeja ativar ou inibir (SANT'ANNA, C. M. R, 2002). No campo da química medicinal, é um termo usado para designar quaisquer cavidades (de moléculas) de interação com fármacos. A identificação de um alvo molecular, relacionado à doença para a qual se busca desenvolver um tratamento terapêutico adequado, é de suma importância no planejamento racional de fármacos baseado em estrutura, pois visa a identificação do mecanismo de ação deste candidato. Isso possibilita uma análise detalhada de suas características estruturais, auxiliando no desenvolvimento de novos compostos bioativos (MAGALHÃES, C. S.; BARBOSA, H. J. C.; DARDENNE, L. E., 2007, p. 490).

A identificação de potenciais alvos moleculares por meios convencionais utiliza-se de técnicas experimentais de alto custo, que envolvem isolamento, expressão e purificação de proteínas, além de parâmetros robustos para análises. Contudo, com os avanços significativos de técnicas experimentais para identificação, isolamento e preparação de proteínas, é possível encontrar diversos alvos com suas estruturas determinadas por técnicas, tal como cristalografia de raios-X e ressonância magnética nuclear (RMN), disponíveis em bancos de estruturas moleculares virtuais (MAGALHÃES, C. S.; BARBOSA, H. J. C.; DARDENNE, L. E., 2007, p. 491). O Protein Data Bank (PDB) (BERMAN, H. M., 2000), é um dos principais acervos que dispõe de informações estruturais com acesso público, e apresenta uma crescente leva de depósitos de diferentes estruturas nos últimos anos, atualmente contendo aproximadamente 225.000 estruturas (acessado em setembro de 2024).

A disponibilização das estruturas tridimensionais (3D) de alvos biológicos em bancos de dados de acesso público promoveu o desenvolvimento de novas estratégias no planejamento de compostos bioativos, sendo conhecidas como *Structure-Based Drug Design* (SBDD, ou planejamento de fármacos baseado na estrutura do alvo molecular). Métodos computacionais têm sido cada vez mais utilizados no planejamento racional de medicamentos baseado na estrutura do receptor, sendo considerado uma parte fundamental nas descobertas iniciais associadas à química teórica computacional e à química medicinal. Além de reduzir os altos custos envolvidos no uso de técnicas tradicionais, esses métodos otimizam este

processo na busca por um alvo biológico promissor, bem como auxílio no desenho de novos candidatos a fármacos, tornando-o assim uma abordagem mais promissora (ROGNAN, D., 2017; MAGALHÃES, C. S.; BARBOSA, H. J. C.; DARDENNE, L. E., 2007, p. 492).

A partir das informações fornecidas pela estrutura 3D da proteína-alvo, é possível investigar as possíveis regiões de interação moleculares envolvidas entre o ligante e o receptor, o que é necessário para entender seu modo de ação. Nesse contexto, a busca por alvos utilizando técnicas de *Target Fishing*, também denominada de pesca de alvos ou triagem virtual inversa, desponta como uma abordagem em ascensão e amplamente aplicada na descoberta de novos fármacos, devido à sua versatilidade em diversas aplicações. Existem dois tipos de abordagem de *Target Fishing*: (i) baseado na estrutura do ligante e (ii) baseado na estrutura do receptor. Ambas abordagens se utilizam de uma molécula como isca, com o objetivo de identificar novos alvos e potencial atividade biológica para este composto (GALATI, S. et al., 2021).

A identificação de alvos moleculares utilizando métodos baseados na estrutura do ligante é fortemente considerada uma das estratégias mais acessíveis e comumente empregadas para a predição de novos alvos (KOUTSOUKAS, A. et al., 2011). Esses métodos abrangem diferentes abordagens, como princípios de similaridade, impressões digitais moleculares e algoritmos baseados em *machine learning*. Cada uma dessas abordagens são performadas de maneira distinta na predição de alvos moleculares. Atualmente, vários servidores disponíveis *online* utilizam essas técnicas, destacando-se plataformas como SwissTargetPrediction (DAINA, A.; MICHIELIN, O.; ZOETE, V., 2019), PharmMapper (WANG, X. et al., 2017), Similarity Ensemble Approach (WANG, Z. et al., 2016) e TargetNet (YAO, Z.-J. et al., 2016).

Os métodos de identificação de alvos baseados na estrutura do receptor geralmente descrevem abordagens que utilizam informações estruturais de proteínas, associadas a funções de pontuação, para prever interações entre ligantes e seus alvos (KOUTSOUKAS, A. et al., 2011). Essa abordagem depende das informações sobre a estrutura 3D das proteínas e apresenta duas estratégias que podem ser utilizadas: (i) *docking* inverso e (ii) busca de farmacóforos. A busca de farmacóforos requer, no mínimo, um complexo co-cristalizado de referência como ponto de partida. Em contraste, a predição de alvos por meio do *docking* inverso necessita apenas da estrutura tridimensional do alvo e da definição de seu sítio ativo (GALATI, S. et al., 2021).

Recentemente, Viana e colaboradores (2023) empregaram um método de triagem virtual inversa, também conhecido como *docking* inverso, para a predição de alvos utilizando o Autodock Vina (TROTT, O.; OLSON, A. J., 2009), o qual ranqueia os alvos moleculares através do desempenho do algoritmo de pontuação do *docking* molecular deste programa. Este método utiliza um composto representativo (ou isca) para realizar a predição, a fim de esclarecer a possível atividade biológica do composto em análise. A busca por alvos é conduzida em uma biblioteca composta por aproximadamente 23.000 estruturas derivadas do PDB, originalmente contendo ligantes cristalográficos que foram removidos de seus sítios de ligação. Em outra pesquisa recente, Viana e colaboradores (2024) demonstrou a eficácia da triagem virtual inversa como uma ferramenta valiosa para a identificação de potenciais alvos de compostos, assim como a elucidação de seus mecanismos de ação na obtenção de atividade biológica específica, pois o alvo previsto nesse estudo foi comprovado experimentalmente por meio de ensaios *in vitro*.

Portanto, as estratégias de *Target Fishing* visam encontrar uma correspondência ótima entre o alvo biológico com determinada molécula candidata a fármaco, possibilitando a elucidação do mecanismo de ação e das atividades biológicas de compostos cujo alvo permanece desconhecido. Adicionalmente, essa abordagem demonstrou sua eficácia em diversas aplicações, desde a previsão de efeitos colaterais adversos até o reposicionamento de fármacos e a otimização de compostos promissores (LOUNKINE, E. et al., 2012; MÉNDEZ-LUCIO, O. et al., 2017).

3.2 Busca farmacofórica

A busca farmacofórica é um filtro tridimensional utilizado para estudar características específicas a respeito da distribuição espacial do ligante no sítio ativo e como se dão as interações em diferentes regiões (KATSILA, T. et al., 2016). Com o avanço de técnicas instrumentais robustas, a obtenção de informações sobre a estrutura do receptor facilitou a busca por resíduos considerados essenciais em cavidades de ligação, ou seja, em possíveis cavidades de ancoragem para o ligante. Desse modo, uma busca farmacofórica baseada na proteína-alvo pode descrever quais partes do ligante são capazes de se ligar a esses resíduos considerados chave (GALATI, S. et al., 2021; LIONTA, E. et al., 2014).

Com base nas interações não covalentes normalmente observadas na área de química medicinal, tais como interações do tipo π - π , eletrostáticas e hidrofóbicas, um modelo

farmacofórico é definido pelo conjunto de regiões correspondentes a esses tipos de interação dispostas no espaço tridimensional. Em sua essência, além de colaborar na otimização das propriedades dos compostos, um modelo farmacofórico representa a forma de interação de ligantes com um alvo específico. Esses modelos podem ser elaborados a partir das informações estruturais fornecidas pelo complexo ligante-receptor ou de uma biblioteca de ligantes que demonstram atividade biológica (PICCIRILLO, E.; AMARAL, A., 2018; KASERER, T. et al., 2015).

A identificação dos padrões de interação utilizando a abordagem baseada na estrutura do complexo proteína-ligante é realizada de maneira intuitiva, podendo considerar se uma propriedade química de uma molécula está diretamente envolvida no sítio de ligação do ligante ou não (PICCIRILLO, E.; AMARAL, A., 2018). No entanto, em algumas circunstâncias, podem estar disponíveis apenas informações sobre a estrutura do receptor, sem a presença do ligante. Isso pode resultar em interações distintas quando um ligante é acoplado ao possível sítio de interação. No contexto da abordagem de busca baseada na estrutura do ligante, as estruturas tridimensionais de um conjunto de moléculas ativas previamente conhecidas são alinhadas. Esse alinhamento possibilita a identificação das características comuns do farmacóforo que são compartilhadas entre si, as quais devem ser consideradas como características essenciais (KASERER, T. et al., 2015). Existem diferentes modos de atribuir quais regiões de interação são ideais na construção do modelo. Alguns programas descritos na literatura possuem algoritmos que geram automaticamente esses modelos, que podem ser construídos a partir da estrutura do complexo ou do ligante, tais como Discovery Studio (Dassault Systèmes BIOVIA, 2015), LigandScout (WOLBER, G.; LANGER, T., 2005) e Molecular Operating Environment (MOE).

Um modelo farmacofórico é desenvolvido para distinguir entre moléculas ativas e inativas. Para validar esses modelos, alguns parâmetros estatísticos podem ser empregados para avaliar sua qualidade, tais como a especificidade (avalia a capacidade de um classificador binário de diferenciar entre dados ativos e inativos), a sensibilidade (mostra a porcentagem de compostos ativos recuperados pelo modelo no banco de dados) e a área sob a curva *ROC* (do inglês *Receiver Operating Characteristic*). A curva *ROC* é um método bem reconhecido, sendo utilizado como uma forma objetiva de avaliar a habilidade de um modelo de discernir entre duas populações diferentes (KASERER, T. et al., 2015; TRIBALLEAU, N. et al., 2005).

A área sob a curva (*AUC*, do inglês *area under the curve*), é uma das métricas obtidas a partir deste método e indica a probabilidade de um composto ativo obter um valor de pontuação superior ao de um composto inativo, com valores variando de 0 a 1. Curvas com a $AUC = 0.5$ sugerem que o modelo classificou os ligantes de forma aleatória, enquanto valores próximos a 1 indicam que o modelo é capaz de discriminar compostos ativos de inativos (MCGANN, M.; NICHOLLS, A.; ENYEDY, I., 2015). Cada ponto da curva *ROC* corresponde a um par da taxa de verdadeiros positivos em função da taxa de falsos positivos, representando uma fração específica do conjunto de dados. Isso possibilita avaliar o desempenho global de um método de triagem na distinção entre compostos ativos e inativos (EMPEREUR-MOT, C.; ZAGURY, J.; MONTES, M., 2016).

No contexto de planejamento de novos fármacos, quando métodos computacionais são utilizados, é crucial tomar decisões assertivas na seleção ou exclusão de moléculas antes de seguirem para ensaios *in vitro*. Dessa forma, o método da curva *ROC*, ao caracterizar a capacidade dos modelos construídos em identificar compostos ativos e descartar compostos inativos, torna-se uma ferramenta apropriada para esse tipo de abordagem.

3.3 *Docking* receptor-ligante

Um fármaco é uma pequena molécula que atua no organismo com o objetivo de reproduzir uma resposta biológica. Os fármacos atuam em uma determinada região do alvo molecular denominada bolso de ligação, caracterizada por uma cavidade a qual o ligante pode se acoplar, podendo desencadear, dessa forma, uma resposta biológica. O conhecimento do modo de ligação entre o alvo e o ligante é de suma importância para o planejamento racional de medicamentos (MAGALHÃES, C. S.; BARBOSA, H. J. C.; DARDENNE, L. E., 2007, p. 490; VERLI, H., 2014).

Nesse contexto, o método de *docking* receptor-ligante tem como finalidade identificar e quantificar o modo de ligação adequado de um ligante, sejam pequenas moléculas ou macromoléculas, no sítio ativo de um receptor, com o intuito de ativar ou inibir a função desse alvo molecular. De forma abrangente, essa técnica é utilizada como um filtro de possíveis ligantes direcionados a um alvo de interesse, sendo amplamente empregado no contexto de triagem virtual para encontrar novos ligantes, planejamento de fármacos baseados em estrutura, entre outras aplicações (MAGALHÃES, C. S.; BARBOSA, H. J. C.; DARDENNE, L. E., 2007, p. 502; ROGNAN, D., 2017).

O reconhecimento molecular entre a proteína e o ligante baseia-se na complementaridade das propriedades físico-químicas e estruturais das moléculas envolvidas. Essas características determinam a afinidade e especificidade do ligante pelo alvo, sendo influenciadas pelas interações intermoleculares presentes no complexo. Alguns dos principais tipos de interações intermoleculares envolvidas neste processo são interações de van der Waals, interações hidrofóbicas, formação de ligações de hidrogênio, entre outras. Em termos físico-químicos, esse processo é conduzido por uma combinação de efeitos entálpicos e entrópicos, e ambas contribuições são importantes para a interação ligante-receptor (MAGALHÃES, C. S.; BARBOSA, H. J. C.; DARDENNE, L. E., 2007, p. 493).

A técnica de *docking* molecular utiliza-se de algoritmos para realizar predição da afinidade do ligante pelo alvo por meio de duas etapas: (i) investigação conformacional mais estável do ligante no sítio de ligação; (ii) quantificação da afinidade do modo de ligação na estrutura. Os métodos de busca aplicados na etapa (i) produzem uma vasta quantidade de conformações do ligante durante a simulação de *docking*. Deste modo, as funções de pontuação empregadas para quantificar as afinidades de interação, são integradas a esses métodos para analisar a qualidade dessas conformações, permitindo sua ordenação com base na afinidade pelo receptor (MAGALHÃES, C. S.; BARBOSA, H. J. C.; DARDENNE, L. E., 2007, p. 502; VERLI, H., 2014).

Os algoritmos de busca empregados na etapa (i), devido alterações conformacionais que as moléculas podem sofrer durante o reconhecimento molecular, seguem três abordagens: *docking* rígido, *docking* semi-flexível e *docking* flexível. Na abordagem de *docking* rígido, tanto a proteína quanto o ligante são tratados como estruturas estáticas, permitindo apenas a exploração dos graus de liberdade translacionais e rotacionais do ligante. No *docking* semi-flexível, a estrutura do ligante é considerada flexível, enquanto a proteína permanece rígida, possibilitando também a exploração dos graus de liberdade conformacionais. Para o *docking* flexível, o ligante se mantém flexível e, adicionalmente, alguns resíduos da proteína ou toda sua estrutura também são considerados flexíveis (MAGALHÃES, C. S.; BARBOSA, H. J. C.; DARDENNE, L. E., 2007, p. 503; VERLI, H., 2014).

Nos programas de *docking* ligante-receptor, os métodos de busca empregados podem ser classificados em três categorias: métodos de busca sistemática, métodos de busca determinística e métodos de busca estocástica. Nos algoritmos de busca sistemática cada grau de liberdade é atribuído a um conjunto de valores, com o intuito de explorar combinatoriamente todos os graus de liberdade da molécula ao longo do processo de busca.

Nos métodos de busca determinística, o estado de entrada inicial sempre produzirá o mesmo resultado de saída. O terceiro método, a busca estocástica, é caracterizado por movimentos aleatórios, o que resulta em saídas distintas a partir de um mesmo estado inicial de entrada. (VERLI, H., 2014)

Na etapa (ii), a quantificação das afinidades é calculada pelas funções de pontuação (ou avaliação). Atualmente, são aplicadas três classes de funções de pontuação: baseadas em campos de força, empíricas e baseadas em conhecimento. As funções de avaliação baseadas em campos de força são formadas por uma soma de termos de um campo de força molecular clássico, sendo a parametrização possível por meio de dados experimentais ou de cálculos quânticos. As funções de pontuação empíricas são ajustadas para reproduzir dados experimentais associados à energia livre de ligação, por meio da soma de várias funções básicas parametrizadas, que dependem das coordenadas do ligante e do receptor. Já as funções baseadas em conhecimento são projetadas para reproduzir um grande número de estruturas determinadas experimentalmente, com o objetivo de obter implicitamente os efeitos de ligação que são complexos de modelar explicitamente (KITCHEN, D. B. et al., 2004; MAGALHÃES, C. S.; BARBOSA, H. J. C.; DARDENNE, L. E., 2007, p. 497; VERLI, H., 2014).

O procedimento de *re-docking* é um dos meios utilizados para avaliar se um determinado programa ou função de avaliação é capaz de reproduzir uma conformação semelhante ao ligante do complexo obtido experimentalmente. Essa avaliação é realizada por meio do cálculo de RMSD (*root-mean-square deviation*, ou raiz quadrada do desvio quadrático médio), cujo valor reflete o desvio médio entre as poses obtidas no *docking* e a pose do ligante cristalográfico. O valor padrão considerado para saber se as estruturas preditas estão adequadas é de 2.0 Å (MAGALHÃES, C. S.; BARBOSA, H. J. C.; DARDENNE, L. E., 2007, p. 512).

Um dos primeiros programas de *docking* a utilizar funções de pontuação baseadas em campos de força foi o GOLD (*Genetic Optimization for Ligand Docking*), sendo um dos programas mais utilizados até os dias atuais. Como método de busca, este programa utiliza um algoritmo genético, que possibilita a identificação rápida de soluções satisfatórias, ainda que não sejam necessariamente as ideais, para problemas de otimização combinatória. Originalmente, o GOLD tinha apenas uma função de pontuação, a Goldscore, e atualmente conta com mais três funções: ASP, Chemscore e ChemPLP. Em termos de construção, cada função é consideravelmente diferente. A Goldscore utiliza um tratamento específico para

termos de dispersão e repulsão de van der Waals, além de empregar um modelo derivado da estrutura cristalina para os termos relacionados às interações de ligação de hidrogênio e metais. ASP é uma função de pontuação baseada em conhecimento oriunda do PDB. Chemscore é uma função de pontuação empírica que tem como parâmetro 82 complexos de afinidade de ligação conhecida. A função de pontuação ChemPLP trata os contatos neutros e repulsivos com um potencial linear por partes (PLP) (JONES, G. et al., 1997; SOTRIFFER, C., 2011; LIEBESCHUETZ, J. W.; COLE, J. C.; KORB, O., 2012).

3.4 Simulações de Dinâmica Molecular

A dinâmica molecular (DM) é uma técnica computacional que descreve o comportamento das partículas de qualquer sistema em função do tempo, levando em consideração as forças intermoleculares e suas interações. Este método permite, portanto, estudar a evolução temporal das configurações do sistema e, a partir da trajetória molecular gerada, determinar suas propriedades macroscópicas, como energia livre e parâmetros cinéticos. Esses sistemas consistem em um grande conjunto de moléculas, da ordem de $\sim 10^{23}$ partículas, e podem ser físicos, biológicos ou químicos. Basicamente, a ideia por trás da DM consiste na resolução das equações de movimento de Newton para as partículas clássicas do sistema, e assim calcular estatisticamente as propriedades físicas do sistema. Por esse motivo, uma simulação de DM é comumente referida como um experimento computacional, atuando como uma espécie de "microscópio molecular" (MARTÍNEZ, L.; BORIN, I. A.; SKAF, M. S., 2007, p. 413; CICCOTTI, G. et al., 2022).

A flexibilidade do receptor e do ligante é crucial para uma previsão precisa da interação fármaco-receptor, bem como das propriedades termodinâmicas e cinéticas associadas. Simulações de Dinâmica Molecular tem sido cada vez mais utilizadas na descoberta de novos medicamentos, tanto no meio acadêmico quanto no setor industrial. Superando as limitações do design de fármacos baseado em estrutura, como cálculos de *docking* molecular, que por sua vez, não capturam os principais rearranjos conformacionais das proteínas, frequentemente observados durante o processo de ligação do ligante (DE VIVO, M. et al., 2016).

Nas simulações de DM clássicas é empregado um campo de força para estimar as forças entre os átomos em interação e calcular a energia geral do sistema. Cada campo de força define um conjunto de equações matemáticas que descrevem o comportamento

molecular, sendo a parametrização dos campos de força um dos maiores desafios para sua realização. O uso de campos de força acelera consideravelmente os cálculos quando comparado com outros métodos, permitindo simulações de DM longas de grandes sistemas biomoleculares (MARTÍNEZ, L.; BORIN, I. A.; SKAF, M. S., 2007, p. 421; DE VIVO, M. et al., 2016; VERLI, H., 2014). Quando se trata de simulações de sistemas biológicos, os principais campos de força utilizados atualmente são AMBER (CORNELL, W. D. et al., 1995), CHARMM (MACKERELL, A. D. et al., 1998), GROMOS (GUNSTEREN, W. F. V.; BERENDSEN, H. J. C., 1987) e OPLS (JORGENSEN, W. L.; TIRADORIVES, J., 1988).

A realização de simulações de DM requer a aplicação de técnicas específicas em cada etapa do processo, visando descrever as posições e velocidades das partículas ao longo do tempo. A configuração inicial do sistema, que consiste na distribuição da posição espacial inicial das partículas na caixa de simulação, é de suma importância para a realização da simulação. Assim como o cálculo das forças exercidas sobre cada molécula e a determinação das velocidades e acelerações de cada átomo do sistema. A partir dessas configurações, o próximo passo consiste em determinar as novas posições dos átomos no instante de tempo subsequente, e esse processo é reiniciado até atingir o tempo máximo de simulação desejado. O conjunto de configurações e propriedades que permanecem constantes durante a integração das equações de movimento de Newton, representando o estado do sistema, é denominado *ensemble*. Esses conjuntos podem ser NPT (isotérmico-isobárico), NVT (canônico), NVE (microcanônico) ou μ VT (grand-canônico), onde N representa o número de partículas do sistema, P a pressão, V o volume, T a temperatura e μ é o potencial químico. Alguns métodos são empregados para integrar as equações diferenciais de movimento de Newton, tais como os algoritmos *Verlet*, *Leap-frog* e *Verlet-velocidade* (MARTÍNEZ, L.; BORIN, I. A.; SKAF, M. S., 2007, p. 427).

O sistema é simulado em uma caixa de simulação solvatada, onde as partículas interagem com o solvente, estabelecendo uma relação soluto-solvente. Para que o solvente se ajuste adequadamente ao sistema, é necessário realizar uma otimização visando encontrar o estado de menor energia, ou seja, a conformação mais estável para o sistema em análise. Essa caixa de simulação utiliza-se das condições periódicas de contorno, devido aos efeitos de superfície indesejáveis. Após a minimização de energia do sistema, o mesmo precisa passar por um processo de equilibração termodinâmica. Parâmetros como pressão, temperatura, aplicação de restrições, entre outras propriedades, são ajustados nesse processo até que este atinja a estabilidade. Uma vez equilibrado, o sistema é submetido à etapa de simulação de

produção, onde são geradas as trajetórias da DM (VERLI, H., 2014). A partir das trajetórias obtidas durante a etapa de produção é possível calcular diferentes propriedades para o sistema em estudo, tais como RMSD, RMSF (*root-mean square fluctuation*, ou raiz quadrada da flutuação quadrática média) e análises das interações proteína-ligante por meio de uma clusterização (busca pelas conformações mais representativas do sistema).

3.5 Derivados quinolínicos como potenciais inibidores da N-miristoiltransferase

A quinolina é um composto heterocíclico aromático bicíclico que possui um átomo de nitrogênio. Muitos produtos naturais e medicamentos comercializados contêm o núcleo quinolínico, o que destaca sua relevância na descoberta de fármacos (BALA, I. A. et al., 2024). Derivados quinolínicos são amplamente conhecidos na literatura por suas propriedades antimaláricas. No entanto, também apresentam atividade antibacterianas, antifúngicas, antileishmania, anticâncer, entre outras (FOURNET, A. et al., 1996). Diversos estudos foram direcionados para a síntese de novos derivados quinolínicos com potencial atividade biológica antileishmania nos últimos anos (IBRAHIM, T. M. et al., 2023; SABT, A. et al., 2022; CHANQUIA, S. N. et al., 2019; GOPINATH, V. S. et al., 2013).

Mais especificamente para espécies de *Leishmania donovani*, o estudo realizado por Katiyar e colaboradores (2023) em uma série de novos compostos de quinolina-piperazina/pirrolidina e outros derivados de amina heterocíclica, dois compostos exibiram potencial terapêutico *in vitro* contra os amastigotas intracelulares de *L. donovani*. Esses mesmos compostos foram selecionados para realização de testes *in vivo*, o qual um dos compostos demonstrou atividade leishmanicida promissora.

Outro estudo, desta vez realizado por Mazin e colaboradores (2019) para uma série de 15 análogos de ácidos quinolínicos-4-carboxílicos, foram investigados contra o promastigota de *L. donovani* (isolado clínico) em diferentes níveis de concentração contra dois medicamentos utilizados no tratamento terapêutico da leishmaniose (estibogluconato de sódio e anfotericina B) como controles positivos. Entre esses compostos, apenas um dos compostos foi considerado o mais ativo em termos de IC50.

Em um estudo de um conjunto de compostos quinolínicos 2-substituídos realizado por Gopinath e colaboradores (2013), foram investigados a atividade biológica *in vitro* e *in vivo* contra a *L. donovani* para esses compostos. Um número significativo de compostos apresentou atividade *in vitro* potente contra *L. donovani*, bem como um alto índice de

seletividade, ou seja, atividade com baixa citotoxicidade. O composto mais promissor apresentou um valor de IC_{50} de 0,2 nM com uma seletividade 180 vezes maior quando comparado com os outros compostos.

A enzima N-miristoiltransferase (NMT) tem sido amplamente estudada como um alvo biológico promissor para diversos parasitas protozoários, incluindo *Leishmania donovani*. A enzima NMT foi validada em estudos pré-clínicos como um alvo terapêutico para o tratamento de infecções fúngicas e parasitárias (BRANNIGAN, J. A. et al., 2014). Além de ter sido caracterizada para as espécies *Leishmania donovani* e *Leishmania major*, esta enzima aparenta ser essencial para a sobrevivência de promastigotas em ambos os organismos (BRANNIGAN, J. A. et al., 2010; PRICE, H. P. et al., 2003).

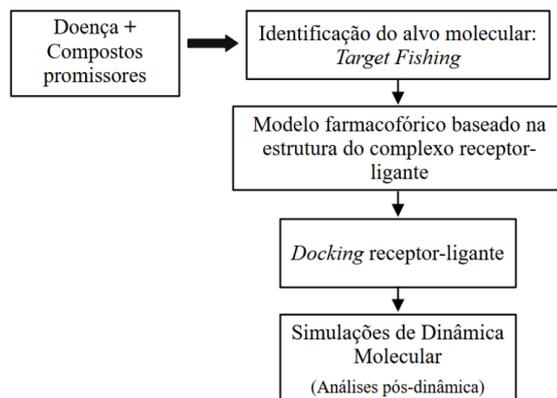
A N-miristoilação de proteínas é a ligação de um ácido graxo saturado de 14 carbonos, o miristato, ao resíduo de glicina N-terminal em um conjunto específico de proteínas celulares, que por sua vez é catalisada pela enzima N-miristoiltransferase (BRANNIGAN, J. A. et al., 2010; TATE, E. W. et al., 2013). Esse processo ocorre após a remoção da metionina inicial, regulando a montagem e estabilidade de complexos proteicos, sendo um alvo promissor para o desenvolvimento de fármacos (SCHLOTT, A. C.; HOLDER, A. A.; TATE, E. W., 2018). A intervenção no processo de miristoilação se mostra uma abordagem importante na busca por novos medicamentos contra doenças parasitárias, no entanto, apesar de ser uma intervenção significativa, as NMTs possuem um alto potencial para desenvolver resistência, o que dificulta a descoberta de medicamentos direcionados a esse alvo (WANG, B. et al., 2021).

A integração de métodos experimentais com os avanços na bioinformática é fundamental para elucidar os mecanismos envolvidos e desenvolver novos inibidores capazes de superar a resistência, tornando as NMTs de patógenos parasitários alvos promissores para o desenvolvimento de fármacos (WANG, B. et al., 2021). Na literatura, alguns resíduos da NMT são considerados cruciais para o mecanismo catalítico da leishmaniose, como His219, Ser330, Tyr217 e Leu410. Desse modo, o desenho de novos inibidores direcionados a estes aminoácidos podem fornecer inibidores de alta afinidade, com potencial promissor para o tratamento dessa doença (NASCIMENTO, S.; DE, M.; OLIMPIO, R., 2023). Vários estudos utilizando técnicas computacionais, tais como *docking* molecular, simulações de DM, triagem farmacofórica, entre outros, foram empregados na descoberta de novos inibidores para a enzima NMT de *L. donovani* e *L. major* (KHALIL, R. et al., 2019; KERSTEN, C. et al., 2019; ORABI, M. A. A. et al., 2023; SOORAM B. et al., 2023).

4 METODOLOGIA

Este estudo utilizou a abordagem de *Target Fishing* na identificação de um potencial alvo biológico para um conjunto de derivados quinolínicos com potencial atividade leishmanicida. A Figura 1 representa as estratégias utilizadas neste estudo e cada etapa será abordada nos tópicos seguintes.

Figura 1 – Fluxograma da metodologia abordada nesse trabalho.

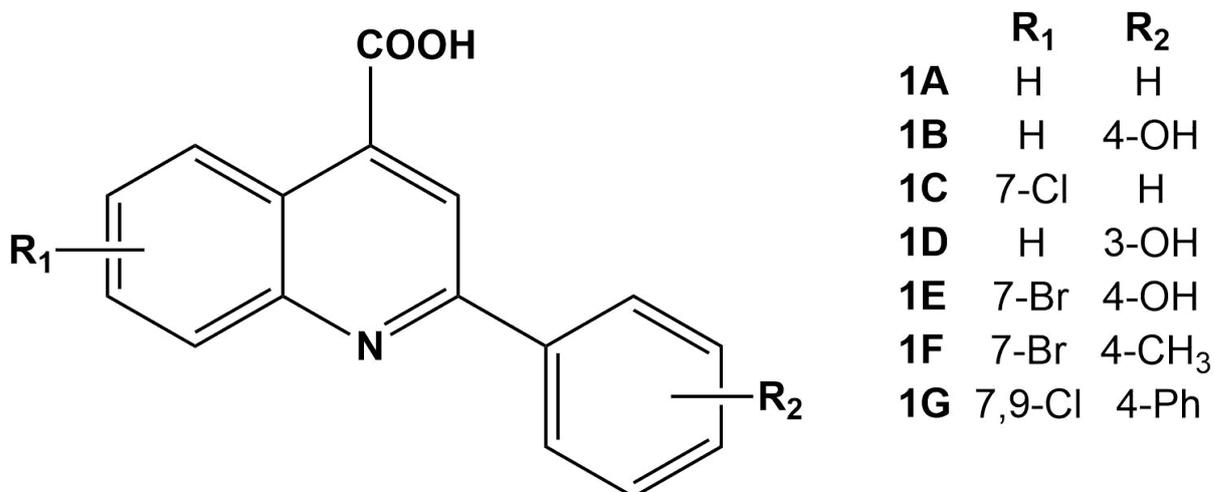


Fonte: Autoria própria.

4.1 Identificação de alvos moleculares por *Target Fishing*

As estruturas 3D dos compostos em estudo, apresentadas na Figura 2, foram modeladas com o programa OpenBabel, ajustado ao pH de 7.4 e minimizadas utilizando o algoritmo *steepest descent* por meio do programa UCSF Chimera (PETTERSEN, E. F., 2004). O método *steepest descent* é robusto e é aplicado para minimizar inicialmente uma estrutura que está distante de um ponto de mínimo (ARFKEN, G. B.; WEBER, H. J.; HARRIS, F. E., 2013).

Figura 2 – Estrutura dos compostos quinolínicos.



Fonte: Autoria própria.

A abordagem de *Target Fishing* baseada na estrutura do receptor foi utilizada a fim de obter enzimas de *L. donovani* que fossem apontadas como possíveis alvos das quinolinas em estudo. Diferentemente da triagem virtual de compostos, em que grandes bibliotecas de compostos são analisadas para encontrar moléculas que tenham alta afinidade por um alvo específico, o objetivo da identificação de alvos (*Target Fishing*) é o de encontrar alvos biológicos que melhor interajam com determinada molécula candidata a fármaco de interesse. Em outras palavras, o intuito é o de se obter, *in silico*, uma correspondência ótima entre o receptor e o ligante (GALATI, S. et al., 2021).

Para a obtenção de alvos com base na estrutura do receptor, foi realizada uma triagem virtual inversa, que consiste na busca de vários receptores para um composto. Esta busca foi realizada numa biblioteca contendo em torno de 23.000 estruturas cristalográficas retiradas do PDB, por meio de *docking* molecular utilizando o programa Autodock Vina dentro de um raio de 5 Å do ligante cristalográfico (VIANA, J. O. et al., 2023). O composto 1G (ver Figura 2) foi selecionado como isca para realizar as simulações de *docking* molecular.

4.2 Modelo farmacofórico baseado na estrutura do complexo receptor-ligante

Dado que as enzimas de N-miristoiltransferase de *L. major* (*LmNMT*) e *L. donovani* (*LdNMT*) compartilham 97.8% de identidade da sequência de aminoácidos (BRANNIGAN, J. A. et al., 2014), foram elaborados quatro modelos farmacofóricos para a enzima NMT de *L. major* com o objetivo de identificar os resíduos que interagem com o ligante no sítio ativo e, assim, analisar as principais regiões de interação. Os modelos farmacofóricos foram construídos a partir da estrutura cristalográfica dos complexos proteína-ligante disponíveis no PDB, com os seguintes códigos: 2WSA, 4CGN, 5A28 e 5G21. Embora cada enzima *LmNMT* tenha um ligante cristalográfico distinto, o sítio ativo é mantido conservado. As enzimas *LmNMT* selecionadas compartilham uma identidade maior que 99%, conforme mostrado na Figura 3.

A enzima NMT de código PDB 2WSA é co-cristalizada com um inibidor da classe das pirazol sulfonamidas, conhecido de DDD646, considerado um potente inibidor da enzima N-miristoiltransferase (BRAND, S. et al., 2011). As enzimas de código PDB 4CGN e 5A28 possuem dados experimentais de K_i (constante de equilíbrio de dissociação) para seus respectivos ligantes cristalográficos (BRANNIGAN, J. A. et al., 2014; RACKHAM, M. D. et al., 2015). A enzima de NMT de código PDB 5G21 está complexada com um inibidor quinolínico, que demonstrou atividade enzimática contra a NMT do *Plasmodium vivax* e do *Plasmodium falciparum* (GONCALVES, V. et al., 2017).

Figura 3 – Alinhamento das sequências de aminoácidos das enzimas *LmNMT*.

PDB 2wsa 2WSA A 11-421	11	AHAFWSTQPVPQTEDETEKIVFAGPMDEPKTVADIPPEEYP IASTFEWWTPNMEAADDI	69
PDB 5g21 5G21 A 11-421	11	AHAFWSTQPVPQTEDETEKIVFAGPMDEPKTVADIPPEEYP IASTFEWWTPNMEAADDI	69
PDB 4cgn 4CGN A 11-421	11	AHAFWSTQPVPQTEDETEKIVFAGPMDEPKTVADIPPEEYP IASTFEWWTPNMEAADDI	69
PDB 5a28 5A28 A 11-421	11	AHAFWSTQPVPQTEDETEKIVFAGPMDEPKTVADIPPEEYP IASTFEWWTPNMEAADDI	69
PDB 2wsa 2WSA A 11-421	70	HA IYELLRDNYVEDDDSMFRFNYSSEELQWALCPPNYIPDWHVAVRRKADKLLAF IAG	128
PDB 5g21 5G21 A 11-421	70	HA IYELLRDNYVEDDDSMFRFNYSSEELQWALCPPNYIPDWHVAVRRKADKLLAF IAG	128
PDB 4cgn 4CGN A 11-421	70	HA IYELLRDNYVEDDDSMFRFNYSSEELQWALCPPNYIPDWHVAVRRKADKLLAF IAG	128
PDB 5a28 5A28 A 11-421	70	HA IYELLRDNYVEDDDSMFRFNYSSEELQWALCPPNYIPDWHVAVRRKADKLLAF IAG	128
PDB 2wsa 2WSA A 11-421	129	VPVTLRMGTPKYMVKVKAQEKGESEEAAYDEPRHICEINFLCVHKQLREKRLAPILIKE	187
PDB 5g21 5G21 A 11-421	129	VPVTLRMGTPKYMVKVKAQEKGESEEAAYDEPRHICEINFLCVHKQLREKRLAPILIKE	187
PDB 4cgn 4CGN A 11-421	129	VPVTLRMGTPKYMVKVKAQEKGESEEAAYDEPRHICEINFLCVHKQLREKRLAPILIKE	187
PDB 5a28 5A28 A 11-421	129	VPVTLRMGTPKYMVKVKAQEKGESEEAAYDEPRHICEINFLCVHKQLREKRLAPILIKE	187
PDB 2wsa 2WSA A 11-421	188	ATRRVNRNTNVQAVYTAGVLLPTPYASGQYFHRSLNPEKLV EIRFSGIPAQYQKFNPM	246
PDB 5g21 5G21 A 11-421	188	ATRRVNRNTNVQAVYTAGVLLPTPYASGQYFHRSLNPEKLV EIRFSGIPAQYQKFNPM	246
PDB 4cgn 4CGN A 11-421	188	ATRRVNRNTNVQAVYTAGVLLPTPYASGQYFHRSLNPEKLV EIRFSGIPAQYQKFNPM	246
PDB 5a28 5A28 A 11-421	188	ATRRVNRNTNVQAVYTAGVLLPTPYASGQYFHRSLNPEKLV EIRFSGIPAQYQKFNPM	246
PDB 2wsa 2WSA A 11-421	247	AMLKRNRYQLPSAPKNSGLREMKPSDVPQVRRILMNYLDSFDVGPVFSDAEISHYLLPRD	305
PDB 5g21 5G21 A 11-421	247	AMLKRNRYQLPSAPKNSGLREMKPSDVPQVRRILMNYLDSFDVGPVFSDAEISHYLLPRD	305
PDB 4cgn 4CGN A 11-421	247	AMLKRNRYQLPSAPKNSGLREMKPSDVPQVRRILMNYLDSFDVGPVFSDAEISHYLLPRD	305
PDB 5a28 5A28 A 11-421	247	AMLKRNRYQLPSAPKNSGLREMKPSDVPQVRRILMNYLDSFDVGPVFSDAEISHYLLPRD	305
PDB 2wsa 2WSA A 11-421	306	GVVFYVVENDKKVTDFFSFYRIPSTVIGNSNYNLLNAAVHYHYAATS IPLHQLILDLL	364
PDB 5g21 5G21 A 11-421	306	GVVFYVVENDKKVTDFFSFYRIPSTVIGNSNYNLLNAAVHYHYAATS IPLHQLILDLL	364
PDB 4cgn 4CGN A 11-421	306	GVVFYVVENDKKVTDFFSFYRIPSTVIGNSNYNLLNAAVHYHYAATS IPLHQLILDLL	364
PDB 5a28 5A28 A 11-421	306	GVVFYVVENDKKVTDFFSFYRIPSTVIGNSNYNLLNAAVHYHYAATS IPLHQLILDLL	364
PDB 2wsa 2WSA A 11-421	365	I V AHSRGFDVCNMVE I LDNRSFVEQLKFGAGDGHLRYYFYNWAYPK I KPSQVALVML	421
PDB 5g21 5G21 A 11-421	365	I V AHSRGFDVCNMVE I LDNRSFVEQLKFGAGDGHLRYYFYNWAYPK I KPSQVALVML	421
PDB 4cgn 4CGN A 11-421	365	I V AHSRGFDVCNMVE I LDNRSFVEQLKFGAGDGHLRYYFYNWAYPK I KPSQVALVML	421
PDB 5a28 5A28 A 11-421	365	I V AHSRGFDVCNMVE I LDNRSFVEQLKFGAGDGHLRYYFYNWAYPK I KPSQVALVML	421

Fonte: Autoria própria. Jalview.

A construção desses modelos foi fundamentada nas principais interações entre o ligante e os resíduos do sítio ativo de cada enzima, conforme indicadas pelo diagrama 2D do programa Discovery Studio 2021. O programa GOLD foi empregado na elaboração dos modelos, utilizando um parâmetro que permite a definição de restrições farmacofóricas. A precisão de um programa de *docking* é condicionada à sua capacidade de reproduzir quantitativamente a pose do cristal e de distinguir entre os compostos ativos e inativos. Devido a isso, foram empregadas as quatro funções de pontuação do GOLD, com o objetivo de analisar o desempenho cada função relacionada aos modelos. Para as regiões com potenciais interações π - π , foi aplicada uma restrição mais rigorosa em comparação com as interações de ligação de hidrogênio.

A curva *ROC* foi empregada como parâmetro estatístico para a validação desses modelos. Nesse contexto, a curva *ROC* foi utilizada para avaliar a eficácia das funções de pontuação do programa GOLD na discriminação entre verdadeiros positivos (compostos ativos) e falsos positivos (*decoys*, compostos que são estruturalmente semelhantes aos ativos). A curva *ROC* é um gráfico da taxa de verdadeiros positivos em função da taxa de falsos positivos para cada composto em um determinado conjunto de dados, possibilitando a avaliação da sensibilidade e especificidade dos modelos (EMPEREUR-MOT, C.; ZAGURY, J.; MONTES, M., 2016).

Dessa forma, uma busca por compostos para organismos de *L. major* para a enzima alvo determinada pela triagem virtual inversa foi realizada através da base de dados do ChEMBL (GAULTON, A. et al., 2011) no dia 06 de novembro de 2023. Foram consideradas apenas moléculas com dados experimentais de K_i para a triagem, as quais foram divididas em compostos considerados ativos e inativos. Esta divisão foi baseada no valor de $K_i=10$ nM do ligante cristalográfico da enzima N-miristoiltransferase (código PDB 5A28) (RACKHAM, M. D. et al., 2015), moléculas com valores de $pK_i > 8$ foram consideradas inativas e para valores de $pK_i < 9$ ativas. Ao total, foram identificados 21 compostos, dos quais foram elencados 9 como ativos (K_i entre 1.3 nM - 8.5 nM) e 12 como inativos (K_i de 13.9 nM - 2600.0 nM), como pode ser verificado na Tabela 1.

Tabela 1 – Moléculas obtidas do banco de dados do ChEMBL.

ChEMBL ID	Ki (nM)	ChEMBL ID	Ki (nM)
CHEMBL4532268	1.3	CHEMBL3912318	19.8
CHEMBL3357688	1.4	CHEMBL3770219	24.8
CHEMBL3912318	1.6	CHEMBL4532268	36.6
CHEMBL4532268	2	CHEMBL1230468	41.3
CHEMBL3912318	2.3	CHEMBL4435880	52.3
CHEMBL3357688	6	CHEMBL3754110	70.8
CHEMBL4470652	7.3	CHEMBL3344387	280
CHEMBL1230468	8.4	CHEMBL3344386	520
CHEMBL3357688	8.5	CHEMBL3344386	980
CHEMBL1230468	13.9	CHEMBL3344386	2600
CHEMBL4449105	19.6	-	-

Fonte: Autoria própria.

As moléculas identificadas como ativas foram submetidas à plataforma DUD-E (Directory of Useful Decoys - Enhanced) para a geração de *decoys* (MYSINGER, M. M. et al, 2005). Aproximadamente 650 *decoys* foram produzidos a partir das estruturas ativas, e todos foram incluídos na análise. Subsequentemente, as estruturas tridimensionais dos compostos ativos, inativos e dos *decoys* foram construídas utilizando o OpenBabel (O'BOYLE, N. M. et al., 2011), com ajuste para um pH de 7.4.

Os modelos com a $AUC \geq 0.9$ serão considerados para representar os modos de interação para o conjunto de compostos e servirá como estrutura de partida para simulações de dinâmica molecular.

4.3 Docking receptor-ligante

Os *loops* e demais resíduos faltantes das enzimas de código PDB 2WSA e 2WUU foram modelados utilizando o programa Modeller 10.4 (ŠALI, A.; BLUNDELL, T. L., 1993) e a protonação dos resíduos carregados ajustados ao pH 7.4 foi realizada por meio do servidor H++ (GORDON, J. C., 2005).

Para realização dos *dockings*, os sítios de ligação foram definidos com base nos resíduos dentro de uma distância de 10 Å do ligante na estrutura da enzima e nas coordenadas xyz baseadas no centro de massa do ligante cristalográfico de cada enzima *LmNMT*. Moléculas de água foram removidas dos sítios de ligação. O protocolo de encaixe padrão foi aplicado (configurações automáticas, 10 rodadas do algoritmo genético), no entanto, para a realização do *docking* foi determinado que a eficiência fosse máxima (200%) para que a flexibilidade do ligante no ambiente do receptor fosse bem explorada.

Uma análise em consenso foi realizada com o intuito de selecionar quais seriam os compostos quinolínicos de maior afinidade com a enzima *LmNMT* (código PDB 2WSA). A investigação dos modos de interação para as quinolinas em estudo foi realizada com base no melhor modelo previsto, por meio do *docking* molecular utilizando as quatro funções de pontuação do software GOLD. Alguns métodos são utilizados para combinar os resultados individuais dos programas de *docking*. Os resultados foram normalizados utilizando o método *rank-by-number*, que por sua vez, trata-se de um método para combinar múltiplas funções de pontuação, calculando a média dos valores resultantes de cada função (BLANES-MIRA, C. et al., 2022).

Os parâmetros de *docking* que resultarem na reprodução dos modelos farmacofóricos foram também utilizados para a determinação dos modos de interação do composto mais promissor com a enzima NMT de *L. donovani*. O *re-docking* para a enzima NMT de código PDB 2WSA foi realizado para todas funções de pontuação do programa GOLD, com o objetivo de avaliar se as funções estavam reproduzindo bem a pose cristalográfica por meio do RMSD.

4.4 Simulações de Dinâmica Molecular

Os compostos e cofatores foram parametrizados de acordo com o campo de força GAFF2 (WANG, J. et al., 2004), e as suas cargas atômicas parciais foram calculadas utilizando o método AM1-BCC por meio do programa Antechamber (WANG, J. et al., 2006). Foram empregados o campo de força AMBER99SB-ILDN (LINDORFF-LARSEN, K. et al., 2010) para a proteína e o modelo de água TIP3P. As simulações de dinâmica molecular foram realizadas para as enzimas de *Lm*NMT (código PDB 2WSA) e *Ld*NMT (código PDB 2WUU), utilizando as melhores poses previstas para os dois compostos de melhor estimativa obtida pelo *docking* utilizando o programa Gromacs v. 2021.2 (GROMACS, <http://www.gromacs.org/>), sendo rodados 200 ns de produção para cada complexo proteína-ligante.

Todos os complexos foram inseridos em uma caixa cúbica de 15 Å. A carga líquida da proteína foi neutralizada pela adição de íons de sódio e cloro sob uma concentração de 0.15 M. A minimização de energia do sistema foi realizada com o algoritmo *steepest descent*, seguida por uma etapa de aquecimento de 300 K até 315 K (NVT), ao longo de 500 ps. Este relaxamento foi realizado de maneira gradual, com a temperatura variando a cada 5 K. As etapas de termalização (NVT) e pressurização com temperatura constante de 300 K (NPT) foram realizadas logo após o aquecimento dos sistemas, contendo 200 e 350 ps, com a temperatura utilizada de acordo com o estudo *in vitro* de Khalil (2019), respectivamente. Após as etapas de equilíbrio, foram rodados 200 ns de produção. O algoritmo LINCS foi empregado para o tratamento das restrições de ligações intramoleculares em todas as etapas e o método *particle mesh Ewald* (PME) foi usado para as interações Coulômbicas de longo alcance. A temperatura e a pressão foram controladas por um termostato de Nosé-Hoover e um barostato Parrinello-Rahman.

As ferramentas de análise do programa CPPTRAJ (ROE, D. R.; CHEATHAM, T. E., 2013) foram empregadas para avaliar as propriedades estruturais e dinâmicas ao longo das trajetórias, tais como RMSD e RMSF. Uma clusterização foi feita utilizando o Gromacs para avaliar as conformações mais representativas das trajetórias de simulação DM. O algoritmo de clusterização utilizado foi o gromos com raio de corte de 0.2 nm. O cluster mais populoso seguiu para a realização do *docking* molecular utilizando o programa GOLD, a estrutura da proteína foi minimizada antes do *docking* usando o método semi-empírico PM6 usando o programa Mopac 2016 (Stewart Computational Chemistry, <http://www.OpenMOPAC.net>).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Identificação de alvos por *Target Fishing*

A ferramenta de *Target Fishing* baseado na estrutura do receptor, utilizado para a identificação de alvos com potencial atividade biológica para os derivados quinolínicos em estudo, apontou uma série de possíveis alvos em diferentes organismos. A partir desses resultados, foram selecionados os principais alvos específicos para os organismos de *Leishmania*, conforme apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 – Alvos preditos pela triagem virtual inversa.

	PDB ID	Score (kcal/mol)	Nome da proteína	spp
1	5A28	-12.3	N-miristoiltransferase	<i>major</i>
2	4CGN	-12.3	N-miristoiltransferase	<i>major</i>
3	4CYQ	-11.6	N-miristoiltransferase	<i>major</i>
4	4CYN	-11.6	N-miristoiltransferase	<i>major</i>
5	4CYO	-11.4	N-miristoiltransferase	<i>major</i>
6	4CGO	-11.4	N-miristoiltransferase	<i>major</i>
7	4CYP	-11.2	N-miristoiltransferase	<i>major</i>
8	4CGM	-11.1	N-miristoiltransferase	<i>major</i>
9	6EWF	-11.0	N-miristoiltransferase	<i>major</i>
10	5G20	-10.7	N-miristoiltransferase	<i>major</i>
11	5G21	-10.6	N-miristoiltransferase	<i>major</i>
12	1W0C	-10.5	Pteridina redutase	<i>major</i>
13	5USF	-10.4	Tirosil-tRNA sintetase	<i>donovani</i>
14	6GNV	-10.1	N-miristoiltransferase	<i>major</i>
15	6GNU	-10.1	N-miristoiltransferase	<i>major</i>
16	6GNU	-10.1	N-miristoiltransferase	<i>major</i>
17	6GNT	-10.1	N-miristoiltransferase	<i>major</i>
18	6GNS	-10.1	N-miristoiltransferase	<i>major</i>
19	6GNH	-10.1	N-miristoiltransferase	<i>major</i>
20	6EU5	-9.7	N-miristoiltransferase	<i>major</i>
21	5AG6	-9.7	N-miristoiltransferase	<i>major</i>
22	1N1G	-9.5	Glicerol-3-fosfato desidrogenase	<i>mexicana</i>

23	4A33	-9.4	N-miristoiltransferase	<i>major</i>
24	3H4V	-9.4	Pteridina redutase	<i>major</i>
25	2QHX	-9.4	Pteridina reductase	<i>major</i>
26	1M67	-9.4	Glicerol-3-fosfato desidrogenase	<i>mexicana</i>
27	5NTH	-9.3	Leucil aminopeptidase	<i>major</i>
28	2WSA	-9.3	N-miristoiltransferase	<i>major</i>
29	5L4N	-9.2	Pteridina redutase	<i>major</i>
30	2BFP	-9.2	Pteridina redutase	<i>major</i>

Fonte: Autoria própria.

A maioria dos alvos identificados foi relacionada a organismos de *Leishmania major*, sendo a enzima N-miristoiltransferase considerada o alvo mais promissor para essa espécie. Devido à alta identidade entre as sequências de *L. major* e *L. donovani*, que variam entre 90% a 98%, os estudos de *docking* foram conduzidos com base nas enzimas de *L. major*, assim como todo o protocolo de validação deste estudo.

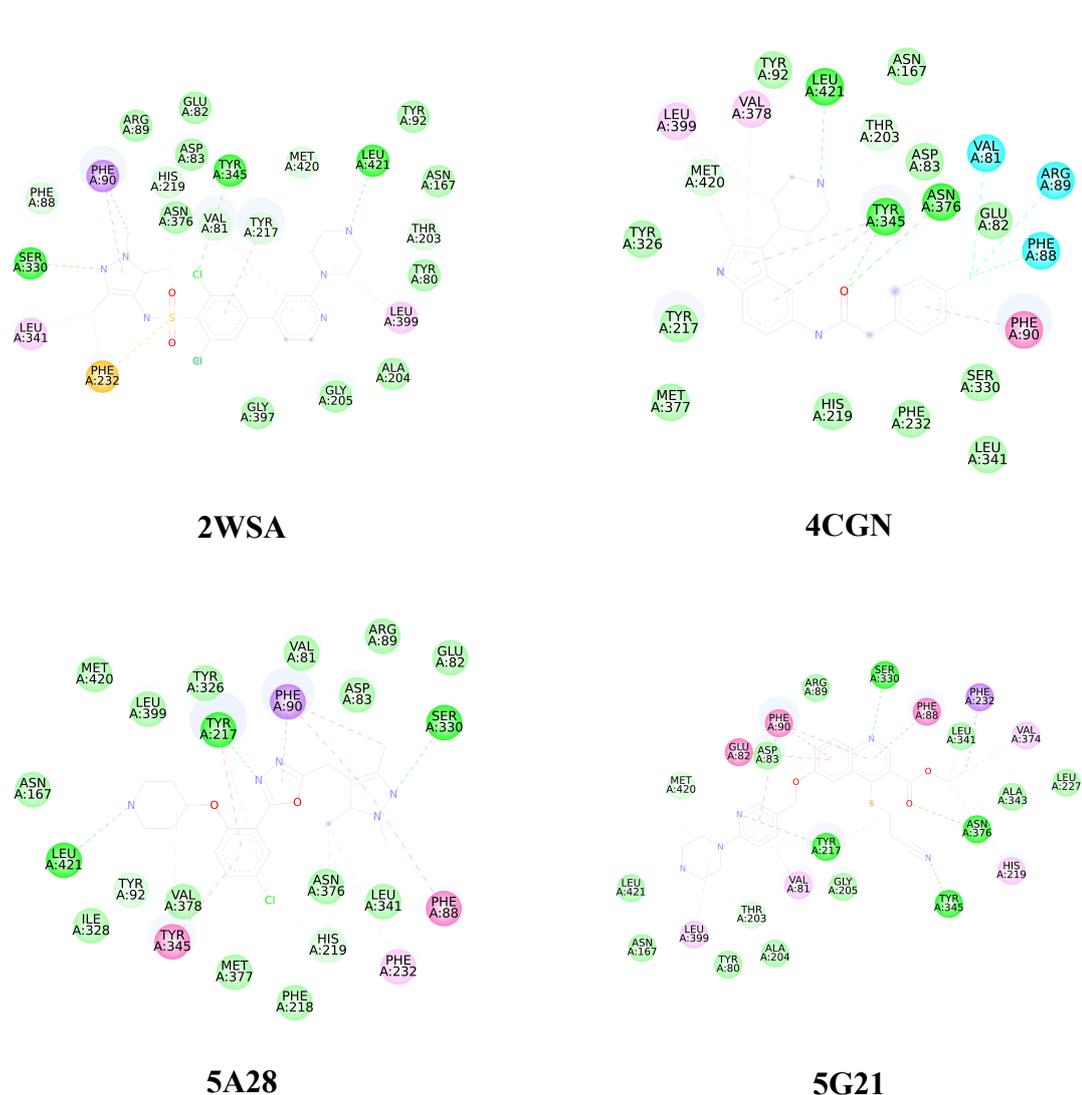
5.2 Validação do protocolo de *docking* molecular escolhido em enzimas de *Leishmania major*

A validação do protocolo de *docking* foi conduzida utilizando parâmetros estatísticos, por meio de uma curva *ROC* obtida pela criação de modelos farmacofóricos. Para isso, foram desenvolvidos quatro modelos farmacofóricos, baseados nas principais interações entre os ligantes e os resíduos do sítio ativo das enzimas *LmNMT*, com diferentes códigos PDB, obtidos na etapa anterior.

5.2.1 Modelos farmacofóricos

As principais interações entre o ligante e o receptor foram analisadas utilizando o programa Discovery Studio 2021, conforme ilustrado na Figura 4.

Figura 4 – Principais interações para as enzimas de *LmNMT*. As interações em rosa e roxo são interações do tipo π - π ; as interações em verde água são interações de van der Waals; as outras tonalidades de verde representam as ligações de hidrogênio.



Fonte: Autoria própria. Discovery Studio 2021.

Foram identificados e listados os resíduos que interagem com os ligantes cristalográficos de cada enzima, bem como os tipos de ligação envolvidos. Os resíduos Tyr217, Phe90, Asn376, Tyr345 e Leu421 demonstraram diferentes tipos de interações com os ligantes de quase todas as enzimas, conforme detalhado na Tabela 3. Em particular, os resíduos Tyr217 e Tyr345 são considerados cruciais para *L. major* na literatura (BRANNIGAN, J. A. et al., 2014). Assim, as regiões onde ocorrem essas interações ligante-resíduo foram designadas como restrições-chave para a construção dos modelos.

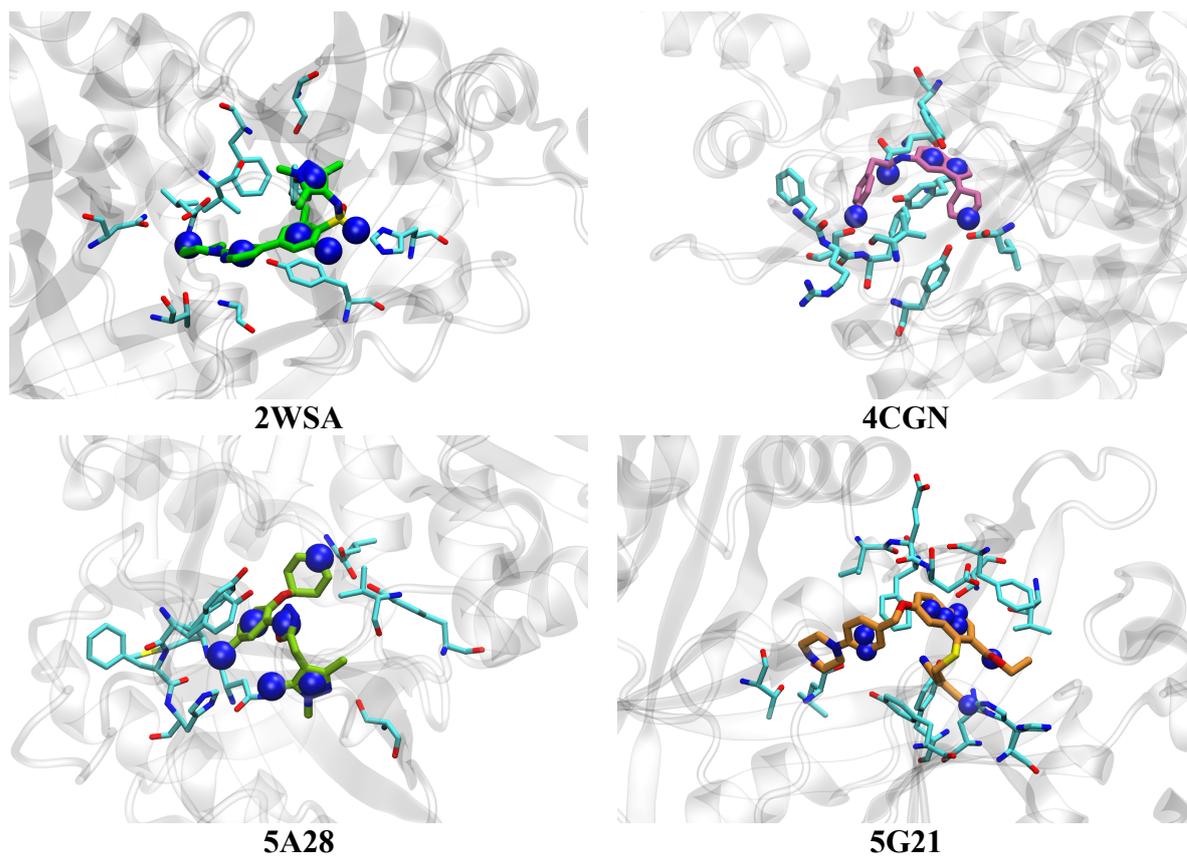
Tabela 3 – Tipo de interação realizada entre os resíduos e o ligante cristalográfico.

Resíduo	2WSA	4CGN	5G21	5A28
Tyr217	Hb	$\pi - \pi$	$\pi - \pi$	-
Phe90	Hm	$\pi - \pi$	Hm	$\pi - \pi$
Phe88	$\pi - \pi$	-	$\pi - \pi$	-
Ser330	Hb	-	Hb	Hb
Asn376	-	Hb	-	Hb
Tyr345	Hb	Hb	$\pi - \pi$	Hm
Val81	Hb	Hb	-	-
Leu421	Hb	Hb	-	Hb
His219	Hb	-	Hb	-

Hb - ligações de hidrogênio, $\pi - \pi$ - interações $\pi - \pi$ e Hm - interações múltiplas (Hb e $\pi - \pi$). Fonte: Autoria própria.

Com base nas regiões de interação identificadas pelo programa Discovery Studio 2021 e seus respectivos tipos, os pontos farmacofóricos definidos para cada modelo são apresentados na Figura 5. O quantitativo de pontos estabelecidos para cada modelo foi diferente, variando entre 5 e 8 atribuições.

O modelo farmacofórico desenvolvido a partir das interações proteína-ligante do PDB 2WSA apresenta seis atributos, considerando as principais interações com os resíduos Tyr217, Leu421, Val81, Tyr345, His219 e Phe90. O modelo referente ao código PDB 4CGN possui cinco atributos, com foco nas interações com os resíduos Leu421, Tyr345 (Hm) e Asn376. No modelo de código PDB 5A28, que contém seis atributos, as interações principais foram estabelecidas com Leu421, Tyr345 (Hm), Tyr217 (Hm), Phe90 e His219. Já o modelo complexo com um inibidor quinolínico (PDB 5G21) apresenta oito atributos, considerando interações com Ser330, Phe90, Phe88, Glu82, Tyr217, Tyr345 e Asn376. Ademais, devido à presença de substituintes halogenados na estrutura dos compostos quinolínicos, as possíveis interações com resíduos relacionados ao flúor e ao cloro também foram incluídas.

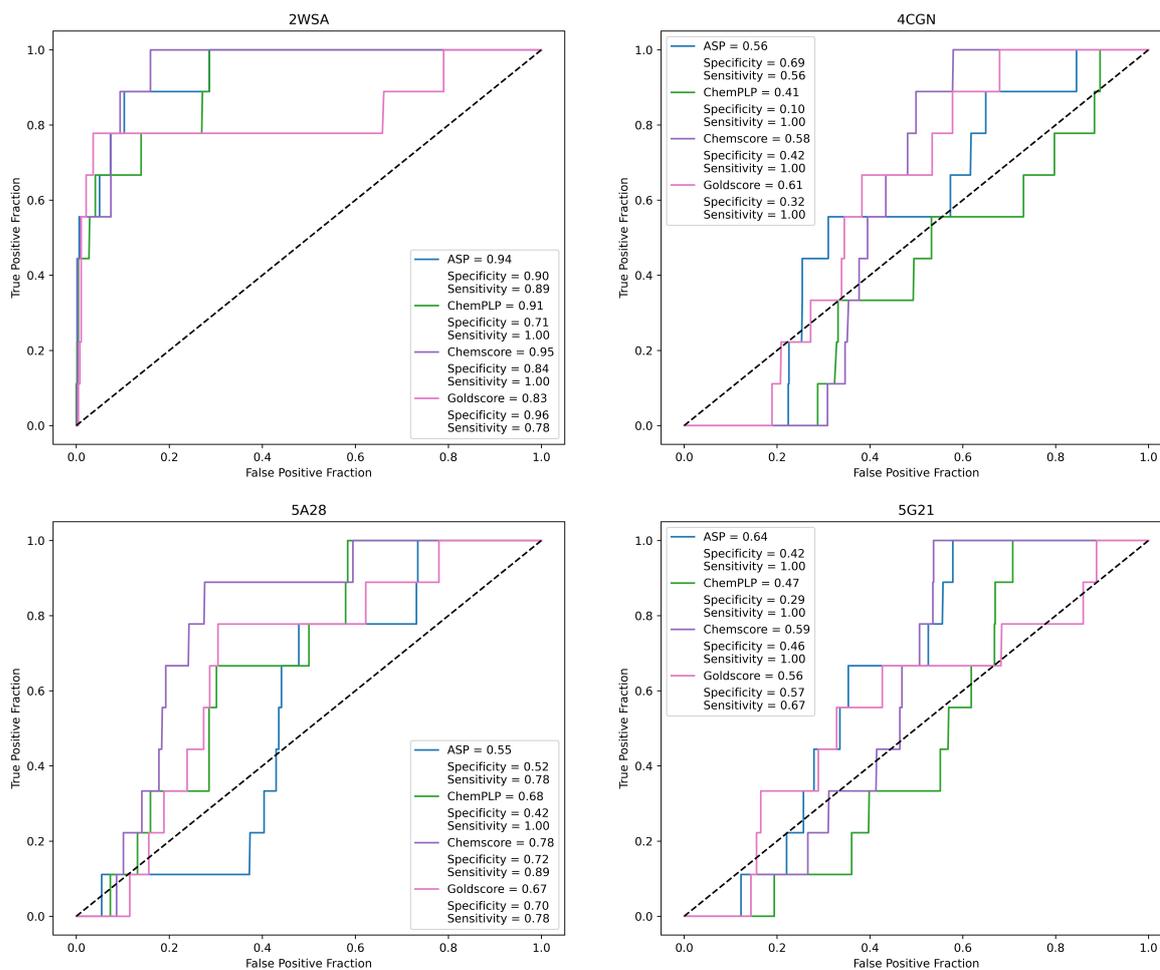
Figura 5 – Pontos farmacofóricos de cada ligante PDB.

Fonte: Autoria própria. Visual Molecular Dynamics.

5.2.2 Curva *ROC*

Como resultado, uma curva *ROC* foi gerada para cada modelo farmacofórico em relação a cada função de pontuação, com o objetivo de avaliar a *AUC* dos modelos. A Figura 6 apresenta as *AUCs* para cada modelo, juntamente com seus respectivos valores de especificidade e sensibilidade. A especificidade avalia a capacidade do modelo de descartar moléculas inativas, enquanto a sensibilidade mostra a habilidade do modelo em identificar compostos ativos. O modelo associado ao código PDB 2WSA apresenta uma sensibilidade variando entre 0.78 e 1.0, com as funções de pontuação ChemPLP e Chemscore alcançando os valores mais elevados. A especificidade deste modelo também é consistente, oscilando entre 0.71 e 0.96, demonstrando uma alta especificidade no descarte de compostos inativos.

Figura 6 – Curva ROC e o cálculo de especificidade e sensibilidade aplicada para cada modelo.



Fonte: Autoria própria.

Para os demais modelos, tanto os valores de sensibilidade quanto da especificidade são mais baixos, embora alguns, como os de códigos PDB 4CGN e 5G21, apresentem alta sensibilidade para determinadas funções de pontuação. O modelo de código PDB 5A28, por sua vez, apresenta valores intermediários tanto de sensibilidade quanto de especificidade, com as funções de pontuação Chemscore e Goldscore exibindo resultados mais consistentes em comparação com as demais funções.

Com base nos valores de *AUC*, o modelo desenvolvido para a enzima de código PDB 2WSA apresentou o melhor desempenho, com *AUCs* superiores a 0.9 para quase todas as funções de pontuação, exceto para a função Goldscore. Isso indica que, em comparação aos outros modelos, este possui uma maior probabilidade de atribuir uma pontuação mais elevada a compostos ativos em relação aos inativos, ou seja, a seleção desses compostos ocorre de maneira não aleatória. A escolha da função *score* a ser utilizada nas próximas etapas foi baseada na função que apresentou os melhores resultados em termos de *AUC*, neste caso, a função Chemscore. Dessa forma, as restrições farmacofóricas estabelecidas para este modelo

foram aplicadas, com o objetivo de representar os modos de ligação, para a realização do *docking* molecular na enzima NMT de *L. donovani*.

5.2.3 *Docking* molecular

Com o intuito de avaliar se as funções de pontuação do programa GOLD reproduziam bem a pose cristalográfica do ligante, a melhor conformação do ligante docado na estrutura da enzima de *L. major* (código PDB 2WSA) obtida durante os *redockings* foi comparada com a sua conformação cristalográfica. Essa comparação foi feita por meio do cálculo do desvio quadrático médio (RMSD) da posição obtida do ligante no *redocking* com sua pose cristalográfica, que por sua vez, foi calculado com as ferramentas do programa Pymol [Schrödinger, LLC, <https://pymol.org/>], obtendo-se os resultados apresentados na Tabela 4.

Tabela 4 – RMSDs da estrutura dos ligantes docados em comparação com a pose cristalográfica.

Função de pontuação	RMSD (Å)
ASP	0.651
ChemPLP	0.851
Chemscore	0.700
Goldscore	0.664

Fonte: Autoria própria.

Todas as funções apresentaram bons resultados em termos de RMSD, com valores menores de 1 Å. As simulações de *docking* foram realizadas para as enzimas *LmNMT* utilizando todas as funções de pontuação do software GOLD, com o objetivo de identificar quais compostos quinolínicos apresentam a melhor interação com o alvo determinado pelo *Target Fishing*. A Tabela 5 apresenta os resultados do *docking* por meio de uma análise em consenso por meio de uma normalização das funções de pontuação pelo método *rank by number*.

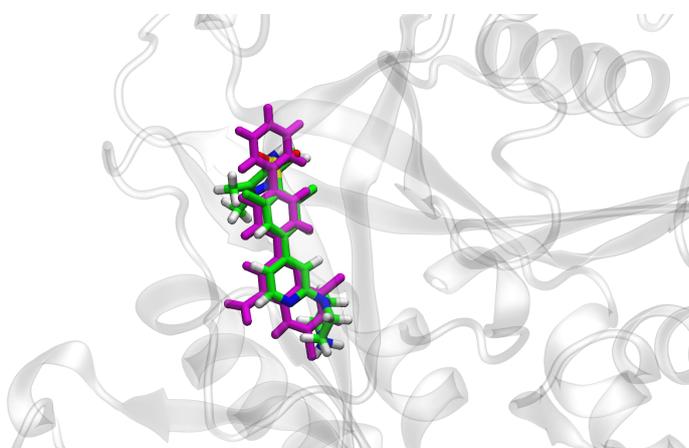
Tabela 5 – Análise em consenso pelo método *rank by number*.

ID	ASP	nASP	PLP	nPLP	CHS	nCHS	GS	nGS	nG
1A	70.09	0.978	97.46	1.000	70.45	0.971	85.38	0.908	0.964
1B	70.61	0.985	96.54	0.991	67.46	0.930	86.96	0.925	0.958
1C	68.39	0.954	95.91	0.984	70.56	0.973	88.58	0.942	0.963
1D	71.68	1.000	95.03	0.975	70.01	0.965	89.02	0.947	0.972
1E	70.72	0.987	75.06	0.770	67.75	0.934	90.00	0.957	0.912
1F	70.67	0.986	73.52	0.754	70.91	0.978	91.78	0.976	0.924
1G	70.6	0.985	96.97	0.995	72.53	1.000	94.03	1.000	0.995

ASP, PLP (ChemPLP), CHS (Chemscore) e GS (Goldscore) - funções de pontuação; nASP, nPLP, nCHS e nGS - normalização das funções de pontuação; nG - normalização geral de todas as funções. Fonte: Autoria própria.

Estudos realizados por Kersten e colaboradores (2019) demonstram que a seletividade de possíveis inibidores pela *LmNMT* em relação a *HsNMT* está relacionada com a mudança na flexibilidade dos resíduos e não na interação com o resíduo em si. Como o sítio ativo da enzima NMT é volumoso, de modo que ao introduzir grupos volumosos nos ligantes haja restrição da flexibilidade no C-terminal da *HsNMT*, levando a uma seletividade ótima para a *LmNMT*. O composto 1G é o composto com grupos mais volumosos do conjunto de quinolinas em estudo, o que pode justificar, isso justifique uma melhor afinidade obtida por esta molécula no sítio ativo da *LmNMT* quando comparada com as outras moléculas. A Figura 7 mostra a comparação da pose obtida no *docking* do ligante cristalográfico com o composto 1G.

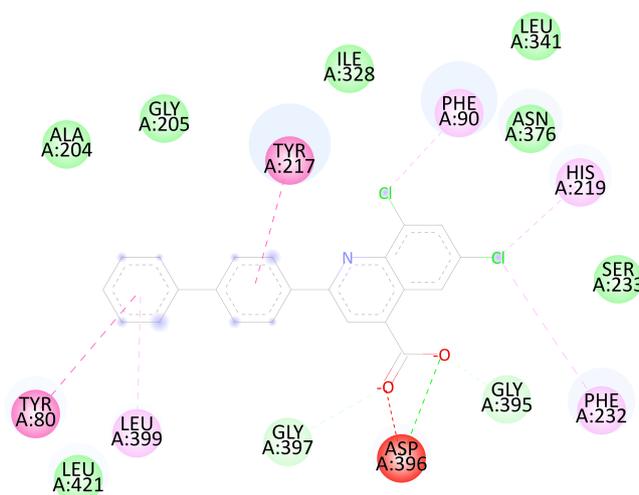
Figura 7 – Sobreposição da melhor pose do *docking* do ligante cristalográfico (verde) e o composto 1G (magenta).



Fonte: Autoria própria. Visual Molecular Dynamics.

O composto 1G foi considerado o mais promissor dentre as moléculas analisadas. Em decorrência disso, as restrições farmacofóricas definidas para o modelo da enzima de código 2WSA foram empregadas à estrutura cristalográfica da N-miristoiltransferase de *L. donovani* (código PDB 2WUU) para a execução do *docking* molecular do composto selecionado, o qual obteve 70.82 como maior pontuação utilizando a função *score* Chemscore. As principais interações entre o composto na pose docada e a enzima *LdNMT* foram analisadas por meio do programa Discovery Studio 2021, revelando interações com quatro resíduos essenciais para *L. donovani*: Phe90, Tyr217, His219 e Asn376 (NASCIMENTO, S.; DE, M.; OLIMPIO, R., 2023). (NASCIMENTO, S.; DE, M.; OLIMPIO, R., 2023). A Figura 8 apresenta as principais interações do ligante docado com os resíduos do sítio ativo.

Figura 8 – Principais interações da pose docada do composto 1G na enzima *LdNMT*. As interações em rosa são interações do tipo π - π ; as interações em verde água são interações de van der Waals; as outras tonalidades de verde representam as ligações de hidrogênio; a interação em vermelho indica uma interação desfavorável.

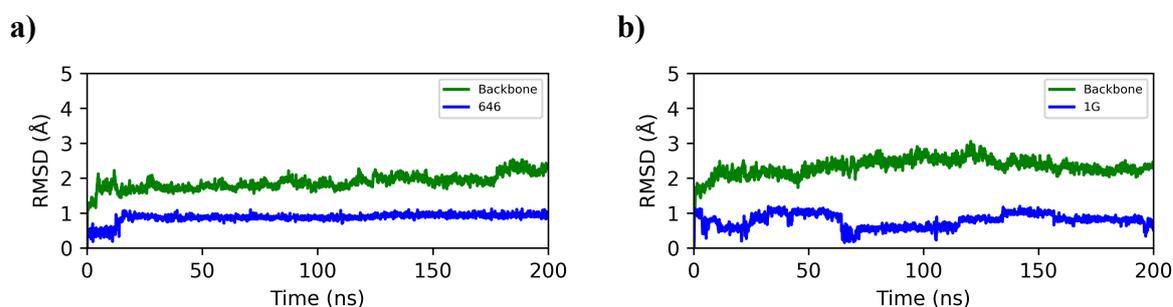


Fonte: Autoria própria. Discovery Studio 2021.

5.3 Simulações de dinâmica molecular para as enzimas N-miristoiltransferase

Por meio das ferramentas de análise do CPPTRAJ, foi possível obter os gráficos de RMSD e RMSF para os átomos do *backbone* da proteína e de cada ligante individualmente. Foi realizada a dinâmica na enzima *LmNMT* com a finalidade de comparar os desvios do ligante cristalográfico em relação ao composto quinolínico mais promissor, enquanto a simulação com a *LdNMT* foi realizada a fim de investigar a estabilidade do composto 1G, uma vez que estudos *in vitro* na *L. donovani* foram publicados (MAZIN et al., 2019). Os gráficos de RMSD e os de RMSF ao longo dos 200 ns da trajetória para as enzimas *LmNMT* (código PDB 2WSA) são apresentados nas Figuras 9 e 10, respectivamente.

Figura 9 – Gráficos dos RMSDs da *LmNMT* complexada com os compostos a) DDD646 e b) 1G.

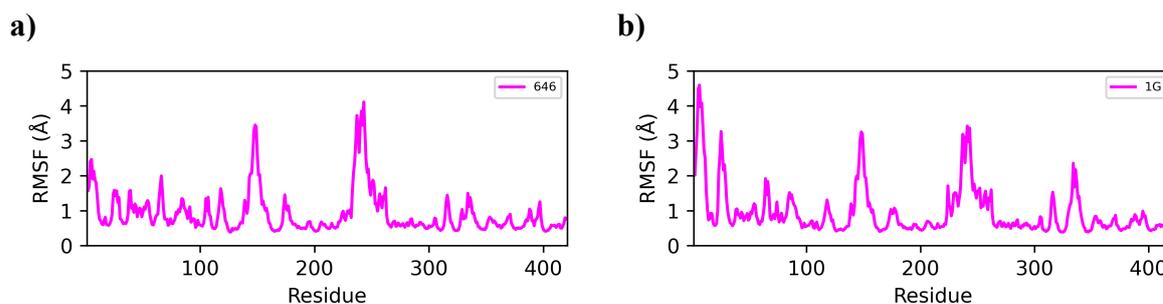


Fonte: Autoria própria.

O RMSD é um dos principais parâmetros utilizados para descrever a estabilidade estrutural de um sistema durante uma simulação DM, seja a análise do movimento interno dos átomos do *backbone* da proteína, quanto de cada ligante individualmente. Os gráficos de RMSD do *backbone* da proteína mostraram desvios menores que 3 Å, com o composto 1G complexado com a enzima *LmNMT* apresentando um perfil similar ao complexo com o ligante PDB. Os ligantes complexados com a enzima *LmNMT* apresentaram desvios menores que 2 Å, o que demonstra uma boa estabilidade dos ligantes complexados com a enzima (ver Figura 9).

As flutuações dos resíduos apresentam valores de RMSF < 5 Å, com um perfil bastante similar entre os complexos de *LmNMT*, como apresentado na Figura 10. Os picos observados nas faixas de resíduos 144-152 e 235-245 são regiões da enzima que não correspondem ao sítio ativo. Os picos iniciais mais acentuados observados no complexo com o composto 1G correspondem à região inicial da enzima, que se encontra na parte superficial da enzima. No entanto, a região final da enzima, que contém resíduos localizados no sítio ativo, apresenta flutuações que não excedem 1 Å.

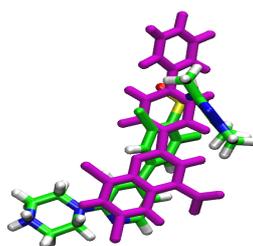
Figura 10 – Gráficos dos RMSFs da *LmNMT* complexada com os compostos a) DDD646 e b) 1G.



Fonte: Autoria própria.

Na etapa da clusterização, os primeiros 100 ns da trajetória foram ignorados, devido a uma boa estabilidade apresentada pelos RMSDs dos complexos com a enzima *LmNMT*. Foram encontrados 3 clusters para ambos os complexos. O cluster mais representativo do complexo com o ligante cristalográfico teve 978 poses das 1000 conformações analisadas. Da mesma forma, o complexo com o composto quinolínico mais promissor exibiu um cluster predominante contendo 791 poses das 1000 conformações avaliadas. Uma clusterização foi feita para cada ligante a fim de avaliar sua pose mais representativa durante os últimos 100 ns de trajetória. A Figura 11 apresenta a conformação mais representativa dos ligantes, onde eles se encontram sobrepostos.

Figura 11 – Sobreposição das conformações mais representativas dos compostos DDD646 (verde) e 1G (magenta).



Fonte: Autoria própria. Visual Molecular Dynamics.

Foi realizado o *docking* molecular na conformação mais representativa do complexo, com o objetivo de avaliar se o ligante demonstra alta afinidade nessa pose. Observou-se um aumento significativo na afinidade dos ligantes no cluster mais representativo, o que sugere que as alterações conformacionais, promovidas pela flexibilidade da estrutura após as

simulações de DM, aprimoraram a interação entre o ligante e o receptor. Os resultados do *docking* são apresentados na Tabela 6.

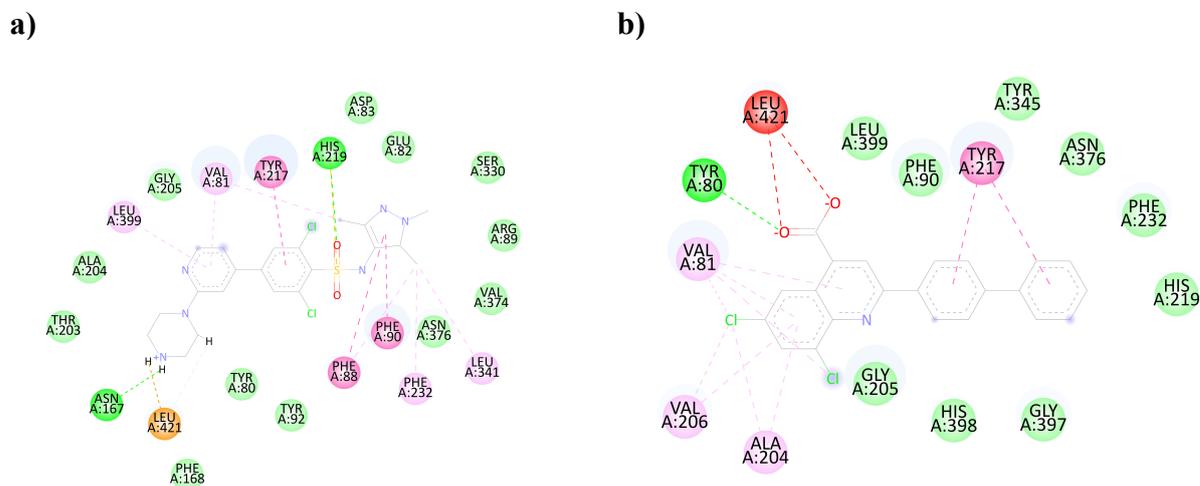
Tabela 6 – Os clusters mais populosos com a melhor *pose* obtida do *docking*.

Composto	Pontuação (Score)	Pontuação (Score)*
DDD646 (cluster 1)	100.87	113.58
1G (cluster 1)	72.53	95.04

*Após clusterização. Fonte: Autoria própria.

Utilizando o programa Discovery Studio 2021, foram analisadas as principais interações da melhor pose de *docking* dos ligantes na conformação mais representativa. Em ambos os casos, foram observadas interações do tipo $\pi - \pi$ com o resíduo Tyr217, considerado essencial no mecanismo de ação da enzima NMT na leishmaniose. Outros tipos de interações cruciais para *L. major* também foram identificados, incluindo interações de van der Waals com os resíduos Tyr345, Thr203 e Gly205 (NASCIMENTO, S.; DE, M.; OLIMPIO, R., 2023). Essas interações estão ilustradas na Figura 12.

Figura 12 – Principais interações da pose docada do composto a) DDD646 e b) 1G no cluster mais representativo da *LmNMT*. As interações em rosa e roxo são interações do tipo $\pi - \pi$; as interações em verde água são interações de van der Waals; as outras tonalidades de verde representam as ligações de hidrogênio; a interação em vermelho indica uma interação desfavorável; interação em laranja é uma ponte salina.

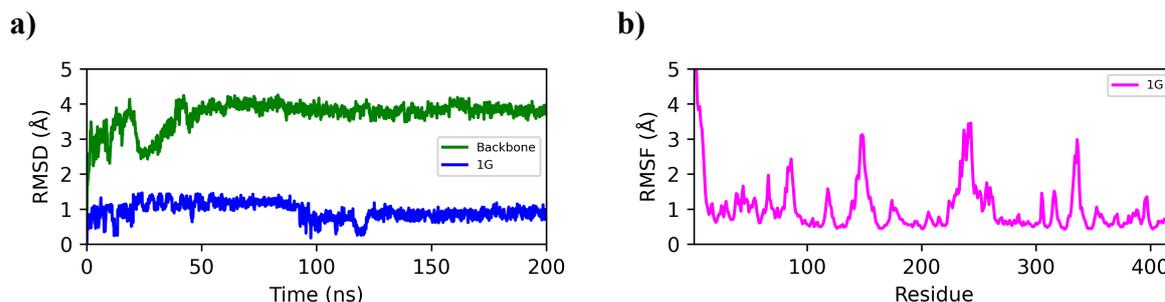


Fonte: Autoria própria. Discovery Studio 2021.

Os gráficos do RMSD e RMSF obtidos a partir da trajetória do complexo *LdNMT* com o composto 1G são apresentados na Figura 13. O RMSD do composto 1G é menor que 2 Å, mostrando estabilidade após 125 ns de simulação. Quando comparado com o RMSD do *backbone* da proteína com o complexo da *LmNMT*, o complexo com a *LdNMT* apresentou desvios maiores. No entanto, manteve-se estabilizado após os 50 ns de simulação, sem apresentar desvios significativos no restante da trajetória. O RMSF apresentou uma flutuação

superior a 5 Å nos resíduos iniciais, correspondendo à região inicial da enzima, especificamente associada à flutuação de um *loop*. As demais flutuações seguem um perfil semelhante ao observado nos RMSFs dos complexos com a *LmNMT*, apresentando flutuações menores que 4 Å para os demais picos. Um pico notável entre os resíduos 334-337 é observado nos gráficos de RMSF dos complexos, sendo o complexo da *LdNMT* aquele com a maior flutuação nessa região. Essa região de resíduos não se encontra situada no sítio ativo.

Figura 13 – Gráficos do a) RMSD e b) RMSF da *LdNMT* complexada com o composto 1G.

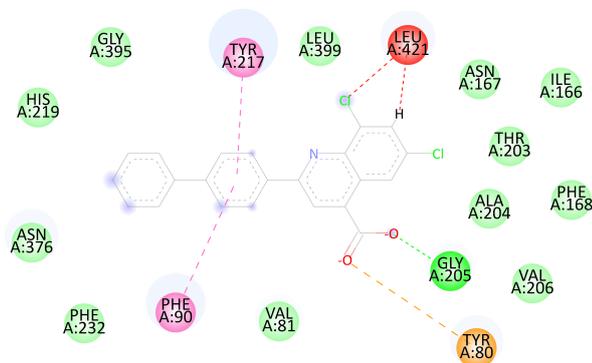


Fonte: Autoria própria.

Da mesma forma que os primeiros 100 ns da trajetória foram desconsiderados para a clusterização dos complexos com a *LmNMT*, esse procedimento foi aplicado ao complexo *LdNMT* com o composto 1G, em função da estabilidade evidenciada pelo RMSD. Foram encontrados 2 clusters, com o mais representativo contendo 998 poses dos 1000 frames analisados. O *docking* molecular foi realizado na conformação mais representativa do complexo, resultando em uma afinidade inferior à observada no *docking* realizado antes da simulação de dinâmica, com uma pontuação de 64.49.

As principais interações entre o receptor e o ligante foram analisadas utilizando o programa Discovery Studio 2021. A Figura 14 evidencia interações do tipo π - π com os resíduos Phe90 e Tyr217, ambos considerados essenciais para a atividade da enzima NMT de *L. donovani*. Essas interações, em particular, sugerem que o composto em questão possui um perfil promissor como potencial inibidor desta enzima, o que reforça a relevância de derivados quinolínicos para futuras investigações no desenvolvimento de novos agentes terapêuticos antileishmania.

Figura 14 – Principais interações da pose docada do composto 1G no cluster mais representativo da *LdNMT*. As interações em rosa e roxo são interações do tipo π - π ; as interações em verde água são interações de van der Waals; as outras tonalidades de verde representam as ligações de hidrogênio; a interação em vermelho indica uma interação desfavorável; interação em laranja é uma interação do tipo π - ânion.



Fonte: Autoria própria. Discovery Studio 2021.

6 CONCLUSÃO

A abordagem de *Target Fishing* utilizada na identificação de potenciais alvos biológicos para a série de quinolinas em estudo sugeriu que a enzima N-miristoiltransferase (NMT) pode ser um possível alvo antileishmania, no entanto, os alvos melhor pontuados no *docking* foram específicos para *Leishmania major*. Por meio da criação dos modelos farmacofóricos foi possível elucidar as principais regiões de interação para esta enzima.

O protocolo de *docking* adequado foi determinado a partir da validação dos modelos por meio de parâmetros estatísticos. O composto 1G foi considerado o derivado quinolínico mais promissor por meio de estudos de *docking* molecular.

Simulações de Dinâmica Molecular (DM) foram conduzidas nas enzimas NMT de *Leishmania major* e *Leishmania donovani* em complexos com o composto 1G, o qual apresentou um perfil farmacodinâmico favorável e alta afinidade por essas enzimas. Ao comparar seu comportamento com o do ligante cristalográfico DDD646, observou-se um comportamento semelhante, sugerindo o potencial do composto 1G como inibidor da enzima NMT. De forma abrangente, os resultados indicam a interação com a *Ld*NMT como um possível mecanismo de ação para a série de quinolinas em estudo.

Referências bibliográficas

- A. REYNOLDS, K.; A. LOUGHLIN, W.; J. YOUNG, D. Quinolines as Chemotherapeutic Agents for Leishmaniasis. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 13, n. 5, p. 730–743, 1 mar. 2013.
- ABONGOMERA, C. et al. The initial effectiveness of liposomal amphotericin B (AmBisome) and miltefosine combination for treatment of visceral leishmaniasis in HIV co-infected patients in Ethiopia: A retrospective cohort study. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 12, n. 5, p. e0006527, 25 maio 2018.
- ARFKEN, G. B.; WEBER, H. J.; HARRIS, F. E. **Mathematical methods for physicists: a comprehensive guide**. Amsterdam (Holanda) Elsevier, 2013.
- BALA, I. A. et al. Quinoline: A versatile bioactive scaffold and its molecular hybridization. **Results in chemistry**, p. 101529–101529, 1 maio 2024.
- BERMAN, H. M. The Protein Data Bank. **Nucleic Acids Research**, v. 28, n. 1, p. 235–242, 2000.
- BLANES-MIRA, C. et al. Comprehensive Survey of Consensus Docking for High-Throughput Virtual Screening. **Molecules**, v. 28, n. 1, p. 175, 25 dez. 2022.
- BRAND, S. et al. Discovery of a Novel Class of Orally Active Trypanocidal N-Myristoyltransferase Inhibitors. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 55, n. 1, p. 140–152, 7 dez. 2011.
- BRANNIGAN, J. A. et al. Diverse modes of binding in structures of *Leishmania major* N-myristoyltransferase with selective inhibitors. **IUCrJ**, v. 1, n. Pt 4, p. 250–260, 17 jun. 2014.
- BRANNIGAN, J. A. et al. N-myristoyltransferase from *Leishmania donovani*: structural and functional characterisation of a potential drug target for visceral leishmaniasis. **Journal of Molecular Biology**, v. 396, n. 4, p. 985–999, 5 mar. 2010.
- CARDOSO, E. et al. Leishmaniasis: History, Evolution of Treatment and the Need for New Drugs. **Current Biotechnology**, v. 3, n. 4, p. 279–288, 31 mar. 2015.
- CHANQUIA, S. N. et al. Synthesis and biological evaluation of new quinoline derivatives as antileishmanial and antitrypanosomal agents. **Bioorganic Chemistry**, v. 83, p. 526–534, mar. 2019.
- CICCOTTI, G. et al. Molecular simulations: past, present, and future (a Topical Issue in EPJB). **The European Physical Journal B**, v. 95, n. 1, jan. 2022.
- CORNELL, W. D. et al. A Second Generation Force Field for the Simulation of Proteins, Nucleic Acids, and Organic Molecules. **Journal of the American Chemical Society**, v. 117, n. 19, p. 5179–5197, maio 1995.
- DAINA, A.; MICHIELIN, O.; ZOETE, V. SwissTargetPrediction: updated data and new features for efficient prediction of protein targets of small molecules. **Nucleic Acids Research**, v. 47, n. W1, p. W357–W364, 20 maio 2019.
- Dassault Systèmes BIOVIA. Discovery Studio Modeling Environment; Dassault Systèmes: San Diego, CA, USA, 2015.

- 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, 8 fev. 2016.
- EMPEREUR-MOT, C.; ZAGURY, J.; MONTES, M. Screening Explorer—An Interactive Tool for the Analysis of Screening Results. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 56, n. 12, p. 2281–2286, 3 nov. 2016.
- FOURNET, A. et al. In vivo efficacy of oral and intralesional administration of 2-substituted quinolines in experimental treatment of new world cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania amazonensis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 40, n. 11, p. 2447–2451, nov. 1996.
- GALATI, S. et al. Recent Advances in In Silico Target Fishing. **Molecules**, v. 26, n. 17, p. 5124, 24 ago. 2021.
- GAULTON, A. et al. ChEMBL: a large-scale bioactivity database for drug discovery. **Nucleic Acids Research**, v. 40, n. D1, p. D1100–D1107, 23 set. 2011.
- GONCALVES, V. et al. Structure-guided optimization of quinoline inhibitors of Plasmodium N-myristoyltransferase. **MedChemComm**, v. 8, n. 1, p. 191–197, 26 jan. 2017.
- GOPINATH, V. S. et al. Design, synthesis and biological evaluation of 2-substituted quinolines as potential antileishmanial agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 69, p. 527–536, 1 nov. 2013.
- GORDON, J. C. et al. H⁺⁺: a server for estimating pK_as and adding missing hydrogens to macromolecules. **Nucleic Acids Research**, v. 33, n. Web Server issue, p. W368–W371, 1 jul. 2005.
- GUNSTEREN, W. F. V.; BERENDSEN, H. J. C., **Groningen Molecular Simulation (GROMOS) Library Manual**, Biomos, Groningen, The Netherlands, 1987.
- HUSSAIN, H. et al. Fruitful Decade for Antileishmanial Compounds from 2002 to Late 2011. **Chemical Reviews**, v. 114, n. 20, p. 10369–10428, 25 set. 2014.
- IBRAHIM, T. M. et al. Tetrahydrobenzo[h]quinoline derivatives as a novel chemotype for dual antileishmanial-antimalarial activity graced with antitubercular activity: Design, synthesis and biological evaluation. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 257, p. 115534–115534, 1 set. 2023.
- 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.
- JORGENSEN, W. L.; TIRADO-RIVES, J. The OPLS [optimized potentials for liquid simulations] potential functions for proteins, energy minimizations for crystals of cyclic peptides and crambin. **Journal of the American Chemical Society**, v. 110, n. 6, p. 1657–1666, 1 mar. 1988.
- KASERER, T. et al. Pharmacophore Models and Pharmacophore-Based Virtual Screening: Concepts and Applications Exemplified on Hydroxysteroid Dehydrogenases. **Molecules**, v. 20, n. 12, p. 22799–22832, 19 dez. 2015.
- KATIYAR, S. et al. Design, synthesis, and biological evaluation of quinoline-piperazine/pyrrolidine derivatives as possible antileishmanial agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 261, p. 115863–115863, 7 out. 2023.

- KATSILA, T. et al. Computational approaches in target identification and drug discovery. **Computational and Structural Biotechnology Journal**, v. 14, p. 177–184, 2016.
- KERSTEN, C. et al. How To Design Selective Ligands for Highly Conserved Binding Sites: A Case Study Using N-Myristoyltransferases as a Model System. **Journal of medicinal chemistry**, v. 63, n. 5, p. 2095–2113, 19 ago. 2019.
- KHALIL, R. et al. Exploring Novel N-Myristoyltransferase Inhibitors: A Molecular Dynamics Simulation Approach. **ACS Omega**, v. 4, n. 9, p. 13658–13670, 15 ago. 2019.
- KITCHEN, D. B. et al. Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: methods and applications. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 3, n. 11, p. 935–949, nov. 2004.
- KOUTSOUKAS, A. et al. From in silico target prediction to multi-target drug design: Current databases, methods and applications. **Journal of Proteomics**, v. 74, n. 12, p. 2554–2574, nov. 2011.
- LIEBESCHUETZ, J. W.; COLE, J. C.; KORB, O. Pose prediction and virtual screening performance of GOLD scoring functions in a standardized test. **Journal of Computer-Aided Molecular Design**, v. 26, n. 6, p. 737–748, 28 fev. 2012.
- LINDORFF-LARSEN, K. et al. Improved side-chain torsion potentials for the Amber ff99SB protein force field. **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics**, p. 1950–1958, 2010.
- LIONTA, E. et al. Structure-Based Virtual Screening for Drug Discovery: Principles, Applications and Recent Advances. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 14, n. 16, p. 1923–1938, 15 out. 2014.
- LOUNKINE, E. et al. Large-scale prediction and testing of drug activity on side-effect targets. **Nature**, v. 486, n. 7403, p. 361–367, jun. 2012.
- MACKERELL, A. D. et al. All-Atom Empirical Potential for Molecular Modeling and Dynamics Studies of Proteins†. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 102, n. 18, p. 3586–3616, abr. 1998.
- MAGALHÃES, C. S.; BARBOSA, H. J. C.; DARDENNE, L. E. Métodos de Docking Receptor-Ligante para o Desenho Racional de Compostos Bioativos. In: MORGON, N. H.; COUTINHO, K. R (Org.). **Métodos de química teórica e modelagem molecular**. São Paulo: Editora Livraria da Física, 2007. p 489-527.
- MARTÍNEZ, L.; BORIN, I. A.; SKAF, M. S., Fundamentos de Simulação por Dinâmica Molecular. In: MORGON, N. H.; COUTINHO, K. R (Org.). **Métodos de química teórica e modelagem molecular**. São Paulo: Editora Livraria da Física, 2007. p 413-452.
- MAZIN et al. Synthesis, Characterization, and Antileishmanial Activity of Certain Quinoline-4-carboxylic Acids. **Journal of Chemistry**, v. 2019, p. 1–9, 3 fev. 2019.
- MCGANN, M.; NICHOLLS, A.; ENYEDY, I. The statistics of virtual screening and lead optimization. **Journal of Computer-Aided Molecular Design**, v. 29, n. 10, p. 923–936, out. 2015.
- MÉNDEZ-LUCIO, O. et al. One Drug for Multiple Targets: A Computational Perspective. **Journal of the Mexican Chemical Society**, v. 60, n. 3, 12 out. 2017.
- Molecular Operating Environment (MOE); Chemical Computing Group Inc.: Montreal, QC, Canada, 2015.

- MYSINGER, M. M. et al. Directory of Useful Decoys, Enhanced (DUD-E): Better Ligands and Decoys for Better Benchmarking. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 55, n. 14, p. 6582–6594, 5 jul. 2012.
- NAKAYAMA, H. et al. In vitro and in vivo antileishmanial efficacy of a new nitrilquinoline against *Leishmania donovani*. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 61, n. 2-3, p. 186–188, fev. 2007.
- NASCIMENTO, S.; DE, M.; OLIMPIO, R. Exploring N-myristoyltransferase as a promising drug target against parasitic neglected tropical diseases. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 258, p. 115550–115550, 8 jun. 2023.
- O'BOYLE, N. M. et al. Open Babel: An open chemical toolbox. *Journal of Cheminformatics*, v. 3, n. 1, 7 out. 2011.
- ORABI, M. A. A. et al. Identification of Potential *Leishmania* N-Myristoyltransferase Inhibitors from *Withania somnifera* (L.) Dunal: A Molecular Docking and Molecular Dynamics Investigation. **Metabolites**, v. 13, n. 1, p. 93, 1 jan. 2023.
- PETTERSEN, E. F. et al. UCSF Chimera--A visualization system for exploratory research and analysis. **Journal of Computational Chemistry**, v. 25, n. 13, p. 1605–1612, 2004.
- PICCIRILLO, E.; AMARAL, A. BUSCA VIRTUAL DE COMPOSTOS BIOATIVOS: CONCEITOS E APLICAÇÕES. **Química Nova**, 2018.
- PRICE, H. P. et al. Myristoyl-CoA:Protein N-Myristoyltransferase, an Essential Enzyme and Potential Drug Target in Kinetoplastid Parasites. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 9, p. 7206–7214, 28 fev. 2003.
- RACKHAM, M. D. et al. Discovery of high affinity inhibitors of *Leishmania donovani* N-myristoyltransferase. **MedChemComm**, v. 6, n. 10, p. 1761–1766, 1 jan. 2015.
- ROE, D. R.; CHEATHAM, T. E. PTRAJ and CPPTRAJ: Software for Processing and Analysis of Molecular Dynamics Trajectory Data. **Journal of Chemical Theory and Computation**, v. 9, n. 7, p. 3084–3095, 25 jun. 2013.
- ROGNAN, D. The impact of in silico screening in the discovery of novel and safer drug candidates. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 175, p. 47–66, jul. 2017.
- SABT, A. et al. New antileishmanial quinoline linked isatin derivatives targeting DHFR-TS and PTR1: Design, synthesis, and molecular modeling studies. **European Journal of Medicinal Chemistry**, p. 114959, nov. 2022.
- ŠALI, A.; BLUNDELL, T. L. Comparative Protein Modelling by Satisfaction of Spatial Restraints. **Journal of Molecular Biology**, v. 234, n. 3, p. 779–815, dez. 1993.
- SANT'ANNA, C. M. R. Glossário de termos usados no planejamento de fármacos (recomendações da IUPAC para 1997). **Química Nova**, v. 25, n. 3, p. 505–512, maio 2002.
- SCHLOTT, A. C.; HOLDER, A. A.; TATE, E. W. N-Myristoylation as a Drug Target in Malaria: Exploring the Role of N-Myristoyltransferase Substrates in the Inhibitor Mode of Action. **ACS Infectious Diseases**, v. 4, n. 4, p. 449–457, 24 jan. 2018.
- SOORAM B. et al. Pharmacophore-guided drug design using LdNMT as a model drug target for leishmaniasis. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics**, v. 42, n. 2, p. 863–875, 25 abr. 2023.
- SOTRIFFER, C. Virtual Screening. **John Wiley & Sons**, 2011.

- TATE, E. W. et al. N-Myristoyltransferase as a potential drug target in malaria and leishmaniasis. **Parasitology**, v. 141, n. 1, p. 37–49, 24 abr. 2013.
- TRIBALLEAU, N. et al. Virtual Screening Workflow Development Guided by the “Receiver Operating Characteristic” Curve Approach. Application to High-Throughput Docking on Metabotropic Glutamate Receptor Subtype 4. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 48, n. 7, p. 2534–2547, 8 mar. 2005.
- TROTT, O.; OLSON, A. J. AutoDock Vina: Improving the Speed and Accuracy of Docking with a New Scoring function, Efficient optimization, and Multithreading. **Journal of Computational Chemistry**, v. 31, n. 2, 2009.
- VERLI, H. **Bioinformática: da biologia à flexibilidade molecular**. São Paulo: SBBq, 2014.
- VIANA, J. O et al. Scaffold repositioning of spiro-acridine derivatives as fungi chitinase inhibitor by target fishing and in vitro studies. **Scientific Reports**, v. 13, n. 1, 5 maio 2023.
- VIANA, J. O. et al. Spiro-Acridine Compound as a Pteridine Reductase 1 Inhibitor: in silico Target Fishing and in vitro Studies. **ChemMedChem**, v. 19, n. 11, 6 mar. 2024.
- WANG, B. et al. Protein N-myristoylation: functions and mechanisms in control of innate immunity. **Cellular & Molecular Immunology**, v. 18, n. 4, p. 878–888, 17 mar. 2021.
- WANG, J. et al. Automatic atom type and bond type perception in molecular mechanical calculations. **Journal of Molecular Graphics and Modelling**, v. 25, n. 2, p. 247–260, out. 2006.
- WANG, J. et al. Development and testing of a general amber force field. **Journal of Computational Chemistry**, v. 25, n. 9, p. 1157–1174, jul 2004.
- WANG, X. et al. PharmMapper 2017 update: a web server for potential drug target identification with a comprehensive target pharmacophore database. **Nucleic Acids Research**, v. 45, n. W1, p. W356–W360, 3 maio 2017.
- WANG, Z. et al. Improving chemical similarity ensemble approach in target prediction. **Journal of Cheminformatics**, v. 8, n. 1, 23 abr. 2016.
- WOLBER, G.; LANGER, T. LigandScout: 3-D Pharmacophores Derived from Protein-Bound Ligands and Their Use as Virtual Screening Filters. **ChemInform**, v. 36, n. 16, 19 abr. 2005.
- YAO, Z.-J. et al. TargetNet: a web service for predicting potential drug–target interaction profiling via multi-target SAR models. **Journal of Computer-aided Molecular Design**, v. 30, n. 5, p. 413–424, 11 maio 2016.
- ZARGHI, A. et al. Synthesis and biological evaluation of new 4-carboxyl quinoline derivatives as cyclooxygenase-2 inhibitors. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 17, n. 14, p. 5312–5317, jul. 2009.