

Universidade de Brasília
Campus Darcy Ribeiro
Curso superior de ciências farmacêuticas

Gabriel Mendonça de Souza

**Avaliação computacional da interação entre a tetrahidrolipstatina com a
enzima Ag85c de *Mycobacterium tuberculosis***

Brasília
2024

Gabriel Mendonça de Souza

Avaliação computacional da interação entre a tetrahidrolipstatina com a enzima Ag85c de *Mycobacterium tuberculosis*

Trabalho Final de Curso apresentado à
Coordenadoria do Curso de Ciências Farmacêuticas
da Universidade de Brasília como requisito parcial
para obtenção do título de Bacharel em Farmácia.

Orientador: Prof. Mauricio Homem de Mello

Brasília

2024

Resumo

O trabalho apresenta a avaliação computacional da interação entre a tetrahidrolipstatina (THL) e a enzima Ag85c de *Mycobacterium tuberculosis*, a bactéria responsável pela tuberculose (TB). A TB é um problema de saúde pública, especialmente após o aumento de casos devido à pandemia de COVID-19. Em conjunto, também há o crescimento da resistência aos medicamentos usualmente empregados na terapia, sendo necessárias novas abordagens terapêuticas. A TB continua a ser uma das principais causas de morte por doenças infecciosas no mundo, e a resistência a medicamentos representa um obstáculo significativo. Um dos possíveis alvos é a enzima Ag85c, que desempenha um papel crucial na patogênese da *Mycobacterium tuberculosis*, responsável pela parte final da síntese de ácidos micólicos, componentes essenciais da parede celular da micobactéria. Através de simulações de dinâmica molecular (MD) utilizando o software GROMACS, realizamos a investigação a interação entre a THL e a Ag85c. Foi utilizada uma abordagem para mimetizar a atividade normal da enzima, através do emprego de duas estruturas cristalográficas da Ag85c, uma sem ligante e outra inibida com o THL, buscando entender como se dá a interação que leva à metabolização e ligação covalente realizada entre a Ag85c e a THL. Para acelerar e otimizar as análises foram realizadas automações em Python para as tarefas repetitivas, levando à minimização erros humanos. Após as análises e interpretação dos resultados, foi possível observar que é mesmo muito provável que a THL seja metabolizada pela própria Ag85c e que esse passo metabólico gere o intermediário necessário para a ligação covalente observada na estrutura cristalográfica observada em literatura. Além disso, corrobora também os dados experimentais observados em nosso laboratório, de inibição do crescimento da bactéria. Conclui-se que a tetrahidrolipstatina apresenta potencial como um inibidor da enzima Ag85c, sugerindo que essa interação pode ser explorada para o desenvolvimento de novas terapias contra a tuberculose. Dentro de um contexto em que se faz necessária a busca de novos fármacos que possam trabalhar com alvos diferentes e menos propensos à resistência bacteriana, a interação demonstrada é relevante para fins do desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas para a TB.

Palavras-Chave: Tetrahidrolipstatina, *Mycobacterium tuberculosis*, Ag85c, Inibição, ácidos micólicos e dinâmica molecular.

Abstract

The work presents the computational evaluation of the interaction between tetrahydrolipstatin (THL) and the Ag85c enzyme of *Mycobacterium tuberculosis*, the bacterium responsible for tuberculosis (TB). TB is a public health problem, especially after the increase in cases due to the COVID-19 pandemic. Together, there is also a growth in resistance to the drugs usually used in therapy, requiring new therapeutic approaches. TB continues to be one of the leading causes of death from infectious diseases in the world, and drug resistance represents a significant obstacle. One of the possible targets is the enzyme Ag85c, which plays a crucial role in the pathogenesis of *Mycobacterium tuberculosis*, and is responsible for the final part of the synthesis of mycolic acids, essential components of the mycobacterial cell wall. Through molecular dynamics (MD) simulations using the GROMACS software, we investigated the interaction between THL and Ag85c. An approach was used to mimic the regular activity of the enzyme through the use of two crystallographic structures of Ag85c, one without ligand and the other inhibited with THL, seeking to understand how the interaction that leads to the metabolization and covalent bonding between Ag85c and THL occurs. To speed up and optimize the analyses, automations were performed in Python for repetitive tasks, leading to the minimization of human errors. After the analysis and interpretation of the results, it was possible to observe that it is very likely that Ag85c itself metabolizes THL and that this metabolic step generates the intermediate necessary for the covalent bond observed in the crystallographic structure observed in the literature. In addition, it also corroborates the experimental data observed in our laboratory of inhibition of the growth of the bacterium. We conclude that tetrahydrolipstatin has potential as an inhibitor of the Ag85c enzyme, suggesting that this interaction can be exploited for the development of new therapies against tuberculosis. In a context in which it is necessary to search for new drugs that can work with different targets and are less prone to bacterial resistance, the interaction demonstrated is relevant for the development of new therapeutic strategies for TB.

Key words: tetrahydrolipstatin, *Mycobacterium tuberculosis*, Ag85c, Inhibition, mycolic acids, molecular dynamics.

Lista de ilustrações

Figura 1 - Rota biossintética dos ácidos micólicos.....	17
Figura 2 - @<TRIPOS>MOLECULE.....	23
Figura 3 - @<TRIPOS>ATOM.....	24
Figura 4 - @TRIPOS>BOND.....	25
Figura 5 - Estrutura do arquivo .pdb para a THL.....	26
Figura 6 - Estrutura do arquivo .pdb para a proteína 3HRH (Ag85c).....	27
Figura 7 -- Linha de comando GROMACS.....	27
Figura 8 - Arquivo conf.gro.....	28
Figura 9 - Adição da topologia no arquivo topol.top.....	29
Figura 10 – Linha de comando gmx editconf.....	30
Figura 11 – Linha de comando gmx solvate.....	30
Figura 12 - Adição de íons no GROMACS.....	31
Figura 13 - Equilíbrio iônico.....	31
Figura 14 - Arquivo de entrada para minimização com comentários em cada linha.....	32
Figura 15 - Minimização de energia.....	33
Figura 16 - Dinâmica para minimização.....	33
Figura 17 - Gráfico do potencial em kJ/mol para minimização do sistema.....	34
Figura 18 - Arquivo ndx de restrição do ligante.....	34
Figura 19 - Exemplo do prompt interativo.....	35
Figura 20 - Conjunto personalizado.....	35
Figura 21 - Geração da restrição.....	36
Figura 22 - Prompt interativo do comando de restrição.....	36
Figura 23 - Exemplo de onde deve ser inserido a configuração.....	36
Figura 24 - Arquivo ndx com índice personalizado.....	37
Figura 25 - Arquivo NPT.mdp utilizado.....	38
Figura 26 - Arquivo de entrada para NVT.....	38
Figura 27 - Dinâmica NVT.....	39
Figura 28 - Arquivo de entrada NPT.....	39
Figura 29 - Dinâmica NPT.....	40
Figura 30 - Arquivo de entrada para MD.....	41
Figura 31 - Dinâmica molecular.....	41
Figura 32 - Equação para cálculo de RMSD.....	42

Figura 33 - Comando para cálculo de RMSD.....	43
Figura 34 - Fórmula para cálculo de RMSF.....	43
Figura 35 - Comando para cálculo de RMSF	44
Figura 36 - Fórmula para cálculo de raio de giro.....	44
Figura 37 - Comando para cálculo de raio de giro	45
Figura 38 – Cálculo das ligações de hidrogênio.....	45
Figura 39 - Cálculo de distância entre pares de átomos ou grupos de átomos.....	46
Figura 40 – Equação da Energia Livre de Gibbs.....	47
Figura 41 – Ligantes utilizados nos estudos	50
Figura 42 – Docagem molecular entre Ag85c e THL (Orlistat).....	52
Figura 43 - Sobreposição das enzimas Ag85C PDB 3HRH e 5VNS.....	53
Figura 44 – Mecanismo de reação fisiológico da Ag85c	54
Figura 45 - RMSD das dinâmicas 3HRH comparando enzima-enzima ao longo do tempo	56
Figura 46 - RMSD das dinâmicas 5VNS comparando enzima-enzima ao longo do tempo	57
Figura 47 - Raio de giro durante a dinâmica entre a Ag85c (PDB 3HRH) e o Orlistat ou Orlistat hidrolisado.....	58
Figura 48 - Raio de giro durante a dinâmica entre a Ag85c (PDB 5VNS) e o Orlistat hidrolisado com ou sem água no sítio catalítico	58
Figura 49 - RMSF do resíduo Glu228 da Ag85c (PDB 3HRH) e o Orlistat ou Orlistat hidrolisado.....	59
Figura 50 - RMSF do resíduo Glu228 da Ag85c (PDB 5VNS) e o Orlistat hidrolisado com ou sem água no sítio catalítico	60
Figura 51 – Ligações de hidrogênio para o resíduo Ser124 durante a dinâmica entre a Ag85c (PDB 3HRH) e o Orlistat ou Orlistat hidrolisado.....	61
Figura 52 – Ligações de hidrogênio para o resíduo Ser124 durante a dinâmica entre a Ag85c (PDB 5VNS) e o Orlistat hidrolisado com ou sem água no sítio catalítico	62
Figura 53 – Ligação de hidrogênio para o resíduo Glu228 durante a dinâmica entre a Ag85c (PDB 3HRH) e o Orlistat ou Orlistat hidrolisado.....	63
Figura 54 - Ligações de hidrogênio para o resíduo Glu228 durante a dinâmica entre a Ag85c (PDB 5VNS) e o Orlistat hidrolisado com ou sem água no sítio catalítico	63

Figura 55 - Pairedistance para o resíduo Ser124 da Ag85c (PDB 3HRH) e o Orlistat ou Orlistat hidrolisado.....	64
Figura 56 – Pairedistance para o resíduo Ser124 da Ag85c (PDB 5VNS) e o Orlistat hidrolisado com ou sem água no sítio catalítico	65
Figura 57 – Entropia de interação da dinâmica 3HRH com THL inteiro ao longo do tempo	66
Figura 58 – Entropia de interação da dinâmica 3HRH com THL hidrolisado ao longo do tempo	66
Figura 59 – Entropia de interação da dinâmica 5VNS com THL hidrolisado com água no sítio catalítico ao longo do tempo	67
Figura 60 – Entropia de interação da dinâmica 5VNS com THL hidrolisado sem água no sítio catalítico ao longo do tempo	67
Figura 61 - Energia livre de Gibbs (ΔG) para todas as dinâmicas realizadas com enzimas e o THL	68
Figura 62 - Energia por aminoácido do resíduo Ser124 da Ag85c (PDB 3HRH) e o Orlistat.....	69
Figura 63 - Energia por aminoácido do resíduo Ser124 da Ag85c (PDB 3HRH) e o Orlistat hidrolisado	70
Figura 64 - Energia por aminoácido do resíduo Ser124 da Ag85c (PDB 5VNS) e o Orlistat hidrolisado com água no sítio catalítico	71
Figura 65 - Energia por aminoácido do resíduo Ser124 da Ag85c (PDB 5VNS) e o Orlistat hidrolisado sem água no sítio catalítico	72
Figura 66 - Energia por aminoácido do resíduo Glu228 da Ag85c (PDB 3HRH) e o Orlistat.....	73
Figura 67 - Energia por aminoácido do resíduo Glu228 da Ag85c (PDB 3HRH) e o Orlistat hidrolisado	74
Figura 68 - Energia por aminoácido do resíduo Glu228 da Ag85c (PDB 5VNS) e o Orlistat hidrolisado com água no sítio catalítico	75
Figura 69 - Energia por aminoácido do resíduo Glu228 da Ag85c (PDB 5VNS) e o Orlistat hidrolisado sem água no sítio catalítico	76
Figura 70 - Energia por aminoácido do resíduo His260 da Ag85c (PDB 3HRH) e o Orlistat.....	77
Figura 71 Energia por aminoácido do resíduo His260 da Ag85c (PDB 3HRH) e o Orlistat hidrolisado	78

Figura 72 - Energia por aminoácido do resíduo His260 da Ag85c (PDB 5VNS) e o Orlistat hidrolisado com água no sítio catalítico	79
Figura 73 - Energia por aminoácido do resíduo Ser124 da Ag85c (PDB 5VNS) e o Orlistat hidrolisado sem água no sítio catalítico	80

Lista de tabelas

Tabela 1 – Características Físico-Químicas dos ligantes utilizados.....	50
Tabela 2 – Resultados do “score” CHEMPLP.Fitness das melhores poses obtidas no docking.....	51

Lista de abreviaturas

MD - Molecular Dynamic

TB - Tuberculose

M.tb - *Mycobacterium tuberculosis*

MA - Ácido micólico

TMM - trealose monomicolato

TDM - trealose dimicolato

mAG - micolil arabinogalactano

ORL - Orlistat

THL - Tetrahidrolipstatina

Sumário

1. Introdução	13
2. Referencial teórico	14
2.2. Ácidos micólicos	15
2.3. Interação do Orlistat (ORL, THL) com esterases lipídicas	17
2.4. Ferramentas para MD	19
3. Objetivos	20
I. Objetivo geral	20
II. Objetivos específicos:.....	20
4. Material e métodos.....	21
4.1. Obtenção das estruturas.....	21
4.2. Docagem molecular	21
4.3. Ferramenta para dinâmica molecular	22
4.4. Campo de força	22
4.5. Preparo das estruturas.....	22
4.6. Formatos de arquivos e manipulação	23
4.7. Solvatação	29
4.8. Neutralização e adição de íons.....	31
4.9. Minimização	31
4.10. Equilíbrio do sistema - parte 1	34
• Restrição do ligante	34
• Termostatos	37
4.11. Equilíbrio do sistema - parte 2.....	37
4.12. Dinâmica molecular	40
4.13. Cálculos utilizando GROMACS	42

4.13.1.	Seleção de aminoácidos	42
•	RMSD	42
•	RMSF.....	43
•	Raio de giro.....	44
•	Ligações de hidrogênio.....	45
•	Pair distance	45
4.14.	gmx_MMPBSA	46
4.14.1.	Entropia.....	47
4.14.2.	Energia livre de Gibbs	47
4.14.3.	Decomposição.....	47
4.15.	Automação de cálculos	48
4.16.	Tratamento de dados	48
4.17.	Obtenção dos gráficos.....	49
5.	Resultados e Discussão.....	49
5.1.	Modelagem dos ligantes	49
5.2.	Docagem Molecular	50
5.3.	Complexo Ag85c-THL.....	53
5.3.1.	Mecanismo de ação da Ag85c	53
5.3.2.	Dinâmicas Moleculares.....	55
5.3.2.1.	RMSD Enzima-Enzima.....	55
5.3.2.2.	Raio de giro	57
5.3.2.3.	Cálculos por resíduo.....	59
5.5.1.	Entropia	65
5.5.2.	Energia livre de Gibbs.....	67
6.	Conclusão	80

1. Introdução

A tuberculose (TB), causada pela *Mycobacterium tuberculosis*, é uma antiga doença que continua sendo um grande desafio de saúde global. Apesar dos avanços da medicina e no desenvolvimento de tratamentos, em 2022 foi a segunda principal causa de morte por um único agente infeccioso, e uma das 10 principais causas de morte no mundo (OMS). Após a pandemia de COVID-19, houve um aumento significativo nos casos de TB (“Global Tuberculosis Report, 2023”). Estudos relatam cepas resistentes a dois dos fármacos mais eficazes, Rifampicina e Isoniazida (ALAME EMANE et al., 2021) (VISHWAKARMA et al., 2023) que fazem parte do tratamento padrão no Brasil, conhecido como RHZE (Rifampicina/Isoniazida/Pirazinamida/Etambutol).

A busca por novos agentes terapêuticos é, portanto, uma prioridade, e a tetrahidrolipstatina surge como uma potencial alternativa. Estudos recentes têm explorado suas interações com enzimas essenciais da *Mycobacterium tuberculosis*, como a Ag85c, que desempenha um papel crucial na patogenicidade da bactéria. A modelagem molecular e as dinâmicas moleculares são ferramentas valiosas na pesquisa biomolecular, permitindo a simulação de interações entre ligantes e alvos biológicos em nível atômico.

Neste contexto, o presente estudo se propõe a investigar as interações entre a tetrahidrolipstatina e a enzima Ag85c, utilizando uma abordagem de simulação molecular. A pesquisa inclui a realização de dinâmicas moleculares com diferentes configurações, como a presença ou ausência de ligantes e moléculas de água no sítio catalítico. Essas variações são essenciais para compreender como modificações estruturais e condições ambientais influenciam a atividade enzimática e a eficácia do ligante.

Por fim, a combinação de técnicas computacionais e a análise detalhada das interações moleculares permitirá uma compreensão mais profunda dos mecanismos de ação da tetrahidrolipstatina. Os resultados obtidos poderão contribuir para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas no combate à tuberculose, especialmente em um cenário onde a resistência a medicamentos se torna cada vez mais comum. A pesquisa não apenas visa elucidar as interações entre o ligante e a enzima, mas também fornecer uma base sólida para futuras investigações na busca por tratamentos mais eficazes contra essa doença.

2. Referencial teórico

2.1. Tuberculose e tratamento

A tuberculose é uma doença infecciosa com amplos registros históricos ao longo da humanidade, tendo os primeiros relatos clínicos da doença datados de aproximadamente 3300 anos atrás (BARBERIS et al., 2017). Na Europa durante o século XIX o patógeno da TB atingiu grande parte da população causando milhares de mortes, sendo uma epidemia conhecida como “peste branca”, refletindo não apenas a aparência dos pacientes, pois os doentes apresentavam palidez causada principalmente pela hipóxia causada, mas também ilustrando o impacto devastador da doença na sociedade (DUBOS; ROSENKRANTZ; DUBOS, 1987).

A *M. tuberculosis* passa por um período latente assintomático após a infecção respiratória inicial (SHAH; DORMAN, 2021) em humanos, levando posteriormente a sintomas normalmente pulmonares causando tosse produtiva, febre, perda ponderal e mal-estar (MOYO et al., 2023).

Nos dias atuais a TB é prevenível por meio da vacina BCG e geralmente curável, mas pós-pandemia de COVID há um aumento de pessoas diagnosticadas, dentre os vários motivos podemos listar o atraso no diagnóstico e tratamento devido ao contexto de pandemia, sendo a Índia e a Indonésia os países responsáveis por 56% do aumento global de casos em 2022, seguidos pelas Filipinas e Paquistão (“Global Tuberculosis Report, 2023”).

A terapia de primeira linha envolve quatro fármacos, sendo eles a Rifampicina, que interfere a síntese de RNA bacteriano (WEHRLI, 1983), a Isoniazida, que inibe a síntese de ácidos micólicos na parede celular da bactéria (TIMMINS; DERETIC, 2006), a Pirazinamida, que atua na redução do pH intracelular e na inibição da síntese de ácidos nucleicos (ZHANG et al., 2014), e o Etambutol, que inibe a síntese de arabinogalactana, um componente importante da parede celular da *M. tuberculosis* (ZHU et al., 2018). Esses fármacos atuam em diferentes etapas do ciclo metabólico da bactéria, contribuindo para a eficácia do tratamento.

A isoniazida (INH) é um pró-fármaco que requer ativação pela enzima KatG da micobactéria, uma catalase-peroxidase. A KatG oxida a INH, gerando espécies reativas que se conjugam com NAD⁺ e NADP⁺, formando adutos que são potentes inibidores de enzimas biossintéticas. Esses adutos inibem a enzima InhA, uma enoil

ACP redutase essencial para a síntese de ácidos micólicos, componentes cruciais da parede celular da micobactéria. No entanto, a eficácia da INH pode ser comprometida por mutações no gene *katG*, especialmente no sítio S315T, que reduzem a toxicidade da INH para a bactéria. Essas mutações alteram a atividade da KatG, diminuindo sua capacidade de ativar a INH, o que resulta em resistência ao fármaco (TIMMINS; DERETIC, 2006).

A combinação dos efeitos da INH - inibição da síntese de lipídios da parede celular, depleção de pools de ácidos nucleicos e depressão metabólica contribui significativamente para sua potência e seletividade contra a *Mycobacterium tuberculosis* (TIMMINS; DERETIC, 2006a). No entanto, o desenvolvimento de novos fármacos que possam atingir alvos importantes da *M. tuberculosis* é essencial para superar os desafios terapêuticos atuais e combater a resistência.

2.2. Ácidos micólicos

Os ácidos micólicos são componentes lipídicos essenciais encontrados em paredes celulares de micobactérias, incluindo a *M.tb*, sendo essenciais para a sobrevivência dessas bactérias desempenhando um papel na manutenção da integridade estrutural e funcional da parede celular, que é notavelmente robusta e impermeável, características atribuídas a presença dos ácidos micólicos. Essa barreira resistente é um fator-chave que contribui para a patogenicidade e a resistência das micobactérias a muitos agentes antimicrobianos (BARRY III et al., 1998).

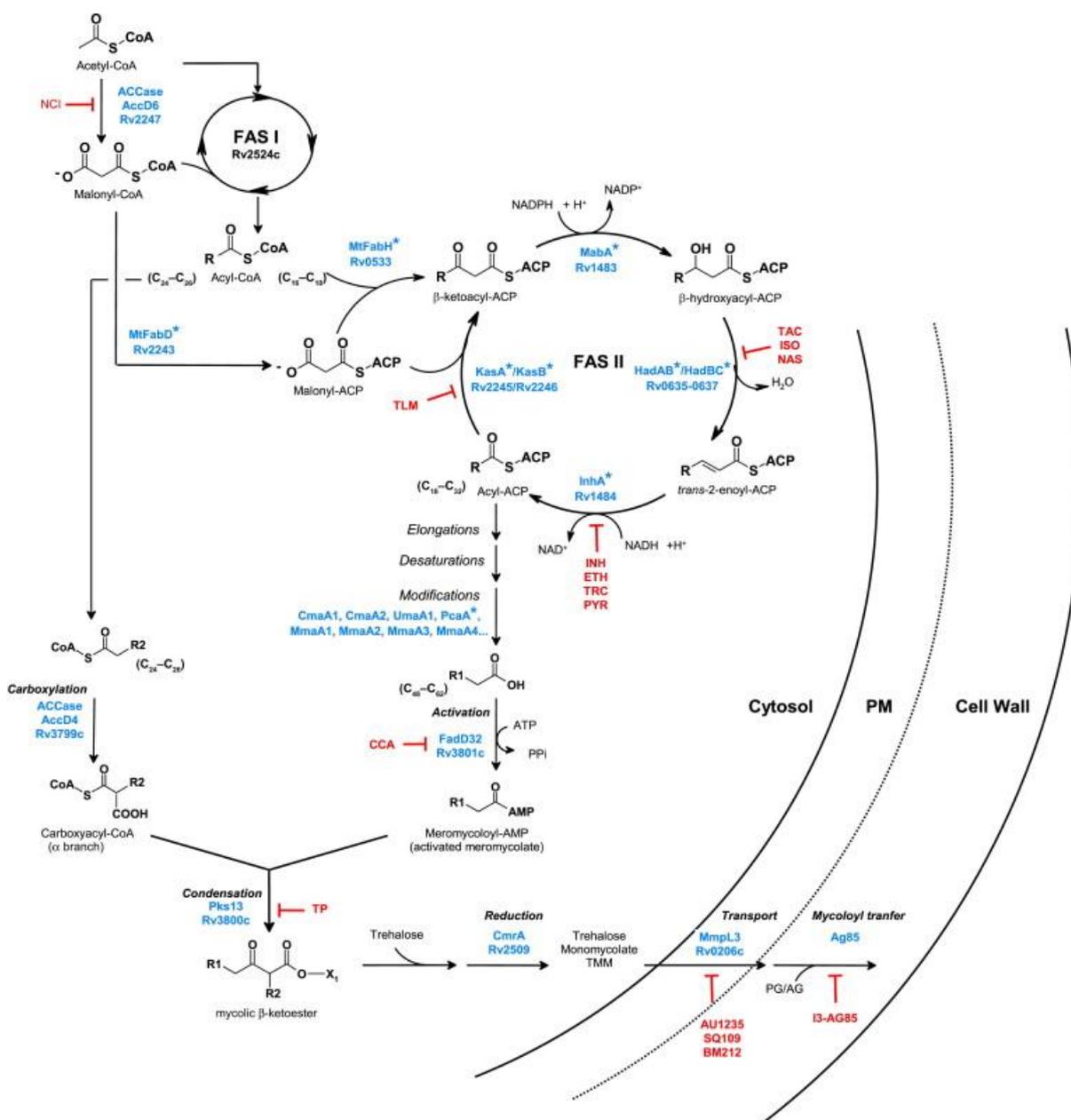
Na composição dos ácidos micólicos, se observa a presença de cadeias longas de ácidos graxos que possuem características estruturais únicas, como cadeias que podem variar em comprimento contendo entre 22 à 90 átomos de carbono. além de outras modificações estruturais como presença de grupos funcionais cíclicos e insaturações. A inclusão de ciclopentanos, por exemplo, contribui para a rigidez e estabilidade da membrana celular. Já as duplas ligações, presentes nas cadeias, influenciam a fluidez e a permeabilidade da membrana, ajustando as propriedades físicas do envelope bacteriano de acordo com as necessidades fisiológicas da célula. A biossíntese dos ácidos micólicos é um processo complexo e energeticamente custoso para a bactéria, mediado por uma série de enzimas especializadas

responsáveis pela elongação e modificação das cadeias de ácidos graxos (TAKAYAMA; WANG; BESRA, 2005).

Além do papel estrutural, os ácidos micólicos também participam de diversas interações biológicas como a formação de biofilmes, que são agregados bacterianos com uma proteção adicional contra agentes externos. Também estão envolvidos na resposta imune do hospedeiro, ajudando as micobactérias a persistirem em ambientes hostis como em macrófagos após fagocitose. Tais características de sobrevivência prolongada são os maiores desafios no tratamento de infecções micobacterianas, tornando a compreensão de todos esses mecanismos um campo fundamental para o desenvolvimento de novas terapias (OJHA et al., 2005).

Para a síntese dos ácidos micólicos (Figura 1) temos uma sequência de reações enzimáticas, sendo o primeiro substrato a acetil-CoA produzido dentro ou fora das mitocôndrias através da via glicolítica, ou do catabolismo de lipídios. Existem duas proteínas de maior relevância na síntese dos ácidos micólicos, uma delas é a FAS-I, responsável por produzir ácidos graxos de cadeia longa (C16-C18 e C24-C26) produzindo o ramo alfa-alquil, e a outra proteína é a FAS-II responsável por fazer o alongamento dos ácidos graxos de C12-C16 para C18-C30 por meio de ciclos de condensação, redução, desidratação e redução, respectivamente. Além disso, há uma importante condensação de Claisen para formação de uma nova ligação carbono-carbono (MARRAKCHI; LANÉELLE; DAFFÉ, 2014) .

Figura 1 - Rota biossintética dos ácidos micólicos.



Fonte: MARRAKCHI; LANÉELLE; DAFFÉ, 2014

2.3. Interação do Orlistat (ORL, THL) com esterases lipídicas

PARKER e colaboradores (2009) caracterizaram a atividade da enzima codificada pelo gene Rv3802, e identificaram sua atividade como sendo de fosfolipase e tioesterase, e que participam no alongamento da cadeia carbônica dos ácidos micólicos. Viram também que a tetrahidrolipstatina (THL – comercializada sob o nome de Orlistat, ORL) é capaz de inibir essa enzima.

Outras proteínas já foram também avaliadas em relação à susceptibilidade de serem inibidas pela THL. RAVINDRAN e colaboradores (2014), utilizando uma sonda de THL fluorescente, avaliaram 247 proteínas de *Mycobacterium bovis* (Bacillus Calmette-Guérin – BCG) e identificaram 14 alvos possíveis da THL, essencialmente lipídios esterases, tioesterases e a enzima Ag85c.

Apesar de ter vários alvos possíveis dentro da micobactéria, a Concentração Inibitória Mínima (CIM) encontrada na literatura está ao redor de 15 μM , considerado ainda um valor alto. Provavelmente a interação com a maior parte dessas proteínas é fraca ou mesmo reversível, no caso das interações covalentes (GOINS et al., 2018b).

Essa reversibilidade da interação da THL com esterases já foi também analisada. A enzima Pks13-TE (do inglês *Polyketide synthase 13 – thioesterase*) é responsável pela condensação de duas cadeias alquílicas dos ácidos micólicos, gerando os ácidos β -ceto micólicos no citoplasma das micobactérias. A inibição da Pks13-TE pela THL também ocorre, mas de maneira não estereosseletiva, o que significa que diferentes isômeros da THL podem inibir a enzima com diferentes graus de eficácia, e também a presença de trealose pode influenciar a inibição da Pks13-TE pela THL, retardando a taxa de inativação inicial da enzima e aumentando a taxa de recuperação da atividade enzimática (GOINS et al., 2018b). O complexo acil-enzima pode estar sujeito também a uma renovação catalítica devido à reativação da enzima pela água. A hidrólise do complexo acil-enzima leva à recuperação da atividade enzimática e à inativação do inibidor, e essa inativação do grupo β -propiolactâmico é análoga à inativação de β -lactamases e carbapenemases (FAKO; ZHANG; LIU, 2014).

Já no caso da interação da THL com a enzima Ag85c, o resultado é um produto de inibição covalente irreversível, onde o THL forma um complexo inibidor-enzima do tipo acil-enzima como resultado de um ataque nucleofílico na THL pela enzima, que ocorre no centro carbonílico do anel β -propiolactâmico pela serina nucleofílica do centro esterásico da enzima, resultando na abertura do anel e ligação covalente estável entre a serina e a THL (GOINS et al., 2018b).

A Ag85c em complexo com a THL já foi alvo de estudo de cristalografia, que demonstrou alta seletividade e especificidade da THL. A ligação do THL à Ag85c provoca uma mudança conformacional na enzima, resultando no deslocamento da histidina catalítica, o que leva à formação de um complexo acil-enzima irreversível, onde a conformação do THL permite que ele se encaixe com pouco impedimento no

sítio ativo da Ag85c, facilitando a formação do complexo covalente (GOINS et al., 2018a).

Esses aspectos destacam a complexidade da inibição das esterases lipídicas das micobactérias, e a necessidade de desenvolver inibidores mais específicos e potentes para combater a tuberculose de forma eficaz.

2.4. Ferramentas para MD

Para MD em ambiente biológico uma das principais ferramentas é o NAMD - NANoscale Molecular Dynamics desenvolvido pelo Theoretical and Computational Biophysics Group (TCBG), localizado no Instituto Beckman da Universidade de Illinois em Urbana-Champaign (UIUC) nos Estados Unidos (“Overview – TCBG”, 2006) com objetivo de ser uma plataforma capaz de realizar MD de maneira eficiente em sistemas biomoleculares de grande escala, assim pode ser utilizado para simulação de complexos biológicos complexos, investigação de mecanismos moleculares em sistemas biológicos, estabilidade e dinâmicas de membranas e canais iônicos, estudos de interação proteína-ligante, ou enzima-ligante, dentre outros. O NAMD tem como seu principal fundamento a escalabilidade, assim foi escrito usando um modelo próprio de programação paralela conhecido como Charm++ (“CHARM++ and NAMD WVU”, 2023) com objetivo de distribuir a carga de trabalho de uma MD entre os múltiplos núcleos de processamento da CPU, permitindo seu ajuste dinâmico a cargas variáveis, garantindo seu desempenho ideal durante todo o processo de simulação, extraindo o máximo de poder computacional em máquinas compostas de clusters de computadores ou supercomputadores através da sua arquitetura de software, levando em consideração a decomposição de domínio, a qual é capaz de dividir o sistema biomolecular em pequenos blocos processados independente atribuídos a cada núcleo de processamento diferente e trabalhados simultaneamente. Entretanto seu uso é gratuito para fins acadêmicos, mas não é de código aberto, portanto não é qualquer pessoa que pode inspecionar, modificar ou aprimorar a ferramenta, além de para uso comercial ser necessário adquirir uma licença de uso.

Outra ferramenta disponível de forma gratuita no mercado é o GROMACS - GROningen MAchine for Chemical Simulations (ABRAHAM et al., 2024), lançado pela Universidade de Groningen na Holanda, suas versões mais atuais assim como o NAMD possuem suporte para GPUs por meio da biblioteca CUDA da NVIDIA. Sua

principal característica é sua versatilidade para diferentes sistemas de modelagem, além de muitas ferramentas para análises e cálculos. Sua licença é *open-source* com licença GNU General Public License (GLP) portanto pode ser utilizado para quaisquer fins sem necessidade de investimento financeiro, além do código ser disponibilizado gratuitamente para comunidade, contando com ferramentas não só para produção de diversas dinâmicas moleculares em vários ambientes, como também para geração de dados para análise dos resultados.

Ambas as ferramentas possuem suporte a diversos campos de força, entretanto enquanto o GROMACS só pode ser utilizado por meio de códigos numa linha de comando, o NAMD pode ser utilizado por meio de uma interface gráfica. No fim ambos são robustos, mas a extração da sua capacidade máxima acontece em situações diferentes, enquanto o GROMACS é altamente versátil no que se refere aos tipos de simulações suportadas e nas possibilidades de cálculos, além de totalmente gratuito, o NAMD se destaca quando se trata de simulações em supercomputadores.

3. Objetivos

I. Objetivo geral

- Investigar a interação entre a tetrahidrolipstatina (Orlistat) e a enzima Ag85c do *Mycobacterium tuberculosis* para compreender os mecanismos da inibição enzimática.

II. Objetivos específicos:

- Realizar a dinâmica molecular da interação entre a THL (íntegra e hidrolisada) e a Ag85c;
- Estudar a dinâmica molecular em diferentes condições, incluindo a presença de água, ou partindo de diferentes estruturas da Ag85c;
- Analisar a variação energética dos aminoácidos da Ag85c durante a interação com a tetrahidrolipstatina (íntegra e hidrolisada);

4. Material e métodos

4.1. Obtenção das estruturas

Inicialmente foi realizada uma busca no RSCB Protein Data Bank – PDB (BERMAN, 2000) para encontrar modelos da enzima Ag85c cristalizada que melhor se adequassem aos nossos objetivos. Foram escolhidos os modelos 3HRH e 5VNS (BERMAN, 2000; SANKI et al., 2009; GOINS et al., 2018a). A Ag85c cristalizada 3HRH não possui ligante ativo no sítio catalítico, e corresponde à forma “ativa” da enzima. Já a 5VNS é a estrutura que foi cristalizada com a THL hidrolisada (com o anel β -propiolactâmico aberto) ligada covalentemente ao resíduo de serina do sítio catalítico, correspondendo à forma “inibida” da enzima. A modelagem dos ligantes (THL “íntegro” e “hidrolisado”) foi realizada com o software Marvin Sketch[®] v.23.8.0 da Chemaxon.

4.2. Docagem molecular

Foram realizadas docagens moleculares dos ligantes (íntegro e hidrolisado) com as estruturas obtidas da Ag85c. Para a 5VNS, como ela foi cristalizada com as moléculas de água dentro do sítio catalítico, avaliamos as interações mantendo as águas do sítio catalítico, e também removendo essas moléculas, para entender a relevância delas na interação da THL com o sítio ativo (a 3HRH não possuía moléculas de água na mesma região, e portanto foi utilizada somente na sua forma “apo”). A docagem foi realizada utilizando-se o software GOLD - Genetic Optimization for Ligand Docking (JONES et al., 1997), v.2024.2.0. O algoritmo foi ajustado para a maior flexibilidade do ligante e do alvo. O sítio de ligação foi determinado pela posição da THL hidrolisada na estrutura original da 5VNS, com um raio de 6Å de distância para formar o bolso de ligação. A posição relativa desse ligante foi copiada para a 3HRH, onde foi possível identificar uma molécula de glicerol ocupando o espaço, que foi então utilizado como referência para o posicionamento dos ligantes (também dentro de um raio de 6Å). Foi utilizada uma eficiência de busca de 200%, e foram geradas 50 poses por ligante (THL íntegro e hidrolisado) por alvo (3HRH, 5VNS e 5VNS com as moléculas de água retidas no sítio catalítico). As poses foram ranqueadas em função do score CHEMPLP.Fitness (KHAMIS; GOMAA, 2015) e as poses com maior

pontuação foram escolhidas para serem as posições iniciais da dinâmica molecular subsequente.

4.3. Ferramenta para dinâmica molecular

Diante das opções disponíveis optamos por realizar o trabalho com o GROMACS (ABRAHAM et al., 2024), dentre os fatores que levaram para escolher a ferramenta podemos listar seu tutorial robusto com diversos casos de exemplo com sistemas biológicos desenvolvidos, as ferramentas de análise encontradas para fácil uso dentro do próprio software, seu modelo de licença, uma comunidade ativa, e outras ferramentas desenvolvidas por terceiros capazes de estender as funcionalidades encontradas por padrão dentro do software que serão de fundamental importância para o trabalho.

4.4. Campo de força

A representação das interações entre os átomos e moléculas num sistema *in silico* é feita através de modelos matemáticos e físicos descritos como campo de força, fundamentais para prever o comportamento em nível atômico e molecular. Assim pode-se calcular as forças que atuam sobre cada átomo ao longo do tempo, permitindo simular o movimento e a interação em tempo real, possibilitando enxergar as interações intra e intermoleculares.

No presente trabalho, utilizamos um campo de força denominado CHARMM (BROOKS et al., 2009), por ser o mais utilizado na literatura em estudos semelhantes aos realizados neste trabalho. A versão CHARMM36-jul2022.ff, em particular, oferece parâmetros precisos para biomoléculas e foi amplamente validada em estudos de proteínas e outros sistemas biológicos.

4.5. Preparo das estruturas

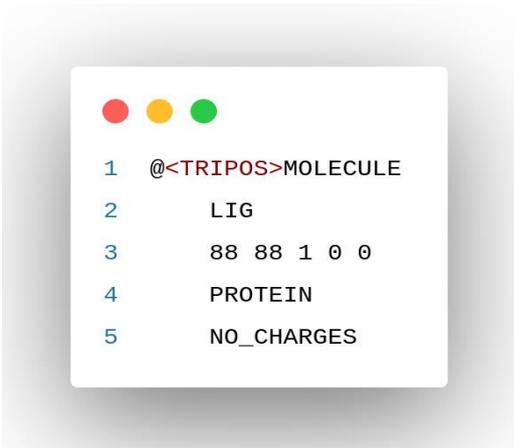
Como as estruturas cristalográficas não possuem os átomos de hidrogênio da proteína (algo comum nos produtos da cristalografia de raios-X), utilizamos o software USFC Chimera v1.18 (PETTERSEN et al., 2004). Os ligantes foram obtidos a partir do software MarvinSketch® no formato “.mol2”.

4.6. Formatos de arquivos e manipulação

Um arquivo .mol2 (Figura 2) geralmente possui em sua estrutura três seções básicas, entretanto pode atingir até mesmo 32 seções diferentes. A primeira sessão conhecida como @<TRIPOS>MOLECULE apresenta seis linhas de dados (KUMAR, 2021):

1. Nome da molécula;
2. Em ordem, número de átomos, ligações, subestruturas, características e conjuntos associados à molécula;
3. Tipo de molécula, sendo os tipos suportados pelo formato .mol2 “small, biopolymer, protein, nucleic_acid e saccharide”;
4. Tipo de cargas associadas à molécula, suportados pelo formato .mol2 “no_charges, del_re, gasteiger, gast_huck, huckel, pullman, gauss80_charges, ampac_charges, mulliken_charges, dict_charges, mmff94_charges e user_charges”;
5. (Optativo): Bits de status SYBYL (HOMER et al., 2008) internos associados à molécula, sendo os valores suportados pelo formato .mol2 “system, invalid_charges, analyzed, substituted, altered, ref_angle”;
6. (Optativo): Comentários que possam estar associados à molécula.

Figura 2 - @<TRIPOS>MOLECULE do arquivo .mol2 referente à THL, note que o nome da molécula está ilustrado como “LIG”.



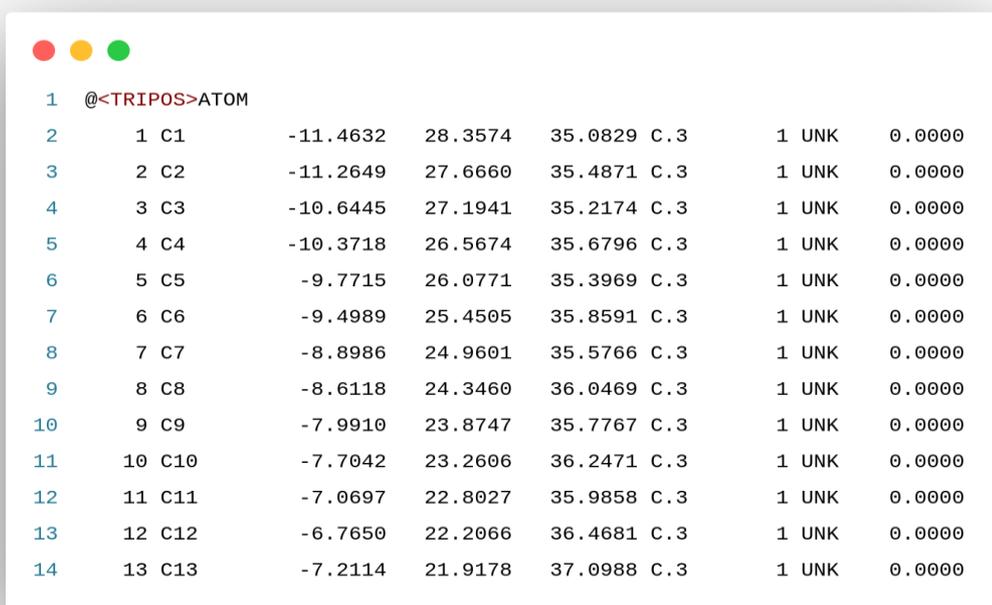
```
1  @<TRIPOS>MOLECULE
2      LIG
3      88 88 1 0 0
4      PROTEIN
5      NO_CHARGES
```

Fonte: Autoria própria

A segunda seção (Figura 3) corresponde a @<TRIPOS> ATOM, onde em uma única linha temos todas as informações necessárias para reconstruir um átomo contido na molécula representada pelo arquivo, sendo cada coluna da linha representada por (KUMAR, 2021):

1. Número de identificação do átomo, usado apenas como referência e não é interpretado por softwares responsáveis por analisar os arquivos .mol2;
2. Nome do átomo;
3. Coordenada X do átomo;
4. Coordenada Y do átomo;
5. Coordenada Z do átomo;
6. Tipo de átomo SYBYL;
7. Número sequencial / número de identificação da subestrutura que contém o átomo;
8. Nome da subestrutura correspondente ao átomo;
9. Carga do átomo.

Figura 3 - @<TRIPOS>ATOM obtido, nas colunas 7 e 8 aparecem o mesmo número e nomes para todas as linhas, já que são da mesma estrutura.



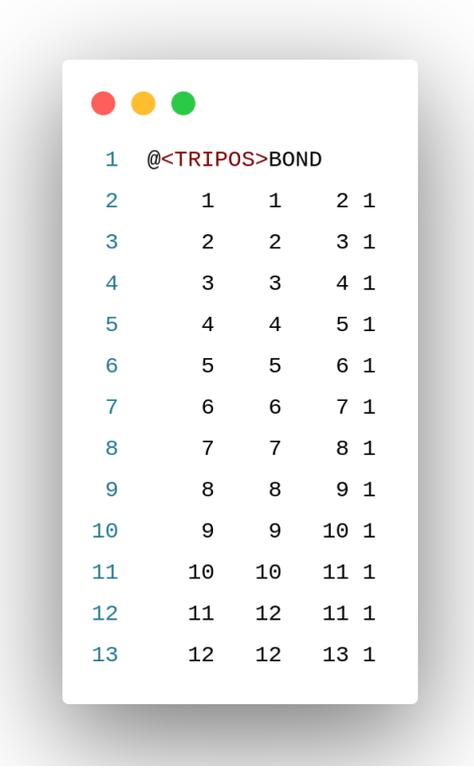
1	@<TRIPOS>ATOM						
2	1 C1	-11.4632	28.3574	35.0829	C.3	1 UNK	0.0000
3	2 C2	-11.2649	27.6660	35.4871	C.3	1 UNK	0.0000
4	3 C3	-10.6445	27.1941	35.2174	C.3	1 UNK	0.0000
5	4 C4	-10.3718	26.5674	35.6796	C.3	1 UNK	0.0000
6	5 C5	-9.7715	26.0771	35.3969	C.3	1 UNK	0.0000
7	6 C6	-9.4989	25.4505	35.8591	C.3	1 UNK	0.0000
8	7 C7	-8.8986	24.9601	35.5766	C.3	1 UNK	0.0000
9	8 C8	-8.6118	24.3460	36.0469	C.3	1 UNK	0.0000
10	9 C9	-7.9910	23.8747	35.7767	C.3	1 UNK	0.0000
11	10 C10	-7.7042	23.2606	36.2471	C.3	1 UNK	0.0000
12	11 C11	-7.0697	22.8027	35.9858	C.3	1 UNK	0.0000
13	12 C12	-6.7650	22.2066	36.4681	C.3	1 UNK	0.0000
14	13 C13	-7.2114	21.9178	37.0988	C.3	1 UNK	0.0000

Fonte: Autoria própria

Na última seção @<TRIPOS>BOND (Figura 4) temos em uma única linha todas as informações para reconstruir as ligações de uma molécula (KUMAR, 2021):

1. Número sequencial / número de identificação para a ligação, não é interpretado por softwares que analisam os arquivos .mol2, e funciona da mesma maneira do @<TRIPOS>ATOM;
2. Número de identificação do átomo em uma extremidade da ligação;
3. Número de identificação do átomo na outra extremidade da ligação;
4. Tipo de ligação SYBYL, correspondente a “1 = simples, 2 = dupla, 3 = tripla, am = amida, ar = aromático, du = dummy, un = unknown e nc = not connected”.

Figura 4 - @<TRIPOS>BOND gerado para a THL.



```

1 @<TRIPOS>BOND
2 1 1 2 1
3 2 2 3 1
4 3 3 4 1
5 4 4 5 1
6 5 5 6 1
7 6 6 7 1
8 7 7 8 1
9 8 8 9 1
10 9 9 10 1
11 10 10 11 1
12 11 12 11 1
13 12 12 13 1

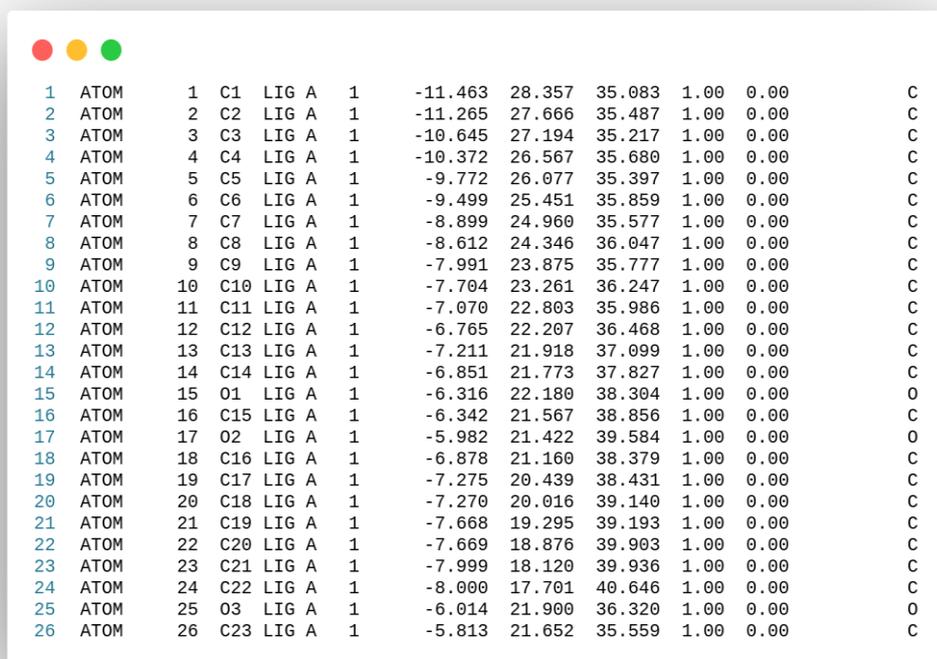
```

Fonte: Autoria própria.

As configurações para os arquivos .pdb são distintas (Figuras 5 e 6), podem ser separados pelas seções ATOM e METATM, entretanto em ambas as seções as linhas possuem as mesmas colunas:

1. Contém as informações do átomo, caso seja um átomo heterogêneo será representado por METATM;
2. Número de identificação único do átomo;
3. Nome do átomo;
4. Resíduo ao qual o átomo pertence;
5. Identificação da cadeia / resíduo ao qual o átomo pertence;
6. Coordenada X;
7. Coordenada Y;
8. Coordenada Z;
9. Fator de ocupância do átomo;
10. Fator de temperatura ou deslocamento do átomo;
11. Símbolo químico do átomo.

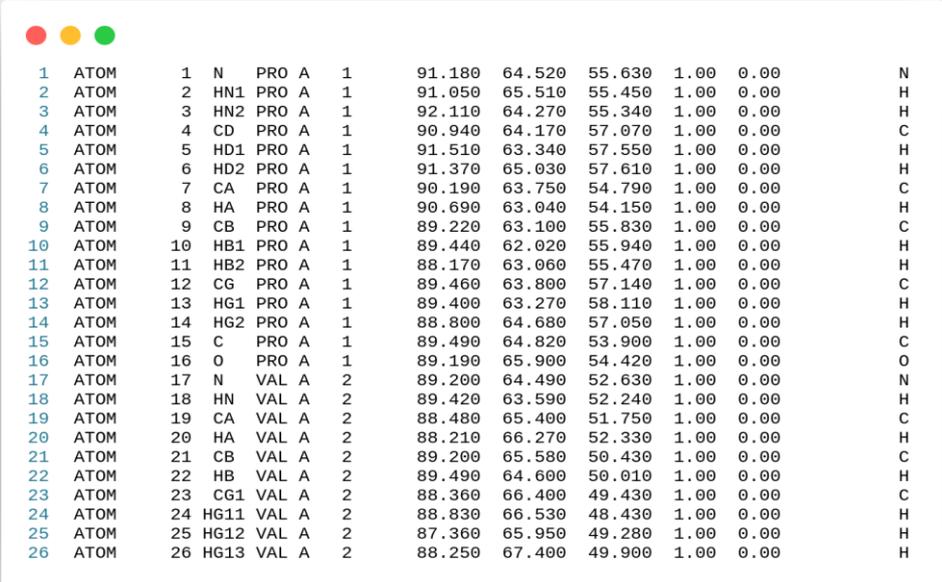
Figura 5 - Estrutura do arquivo .pdb para a THL



1	ATOM	1	C1	LIG	A	1	-11.463	28.357	35.083	1.00	0.00	C
2	ATOM	2	C2	LIG	A	1	-11.265	27.666	35.487	1.00	0.00	C
3	ATOM	3	C3	LIG	A	1	-10.645	27.194	35.217	1.00	0.00	C
4	ATOM	4	C4	LIG	A	1	-10.372	26.567	35.680	1.00	0.00	C
5	ATOM	5	C5	LIG	A	1	-9.772	26.077	35.397	1.00	0.00	C
6	ATOM	6	C6	LIG	A	1	-9.499	25.451	35.859	1.00	0.00	C
7	ATOM	7	C7	LIG	A	1	-8.899	24.960	35.577	1.00	0.00	C
8	ATOM	8	C8	LIG	A	1	-8.612	24.346	36.047	1.00	0.00	C
9	ATOM	9	C9	LIG	A	1	-7.991	23.875	35.777	1.00	0.00	C
10	ATOM	10	C10	LIG	A	1	-7.704	23.261	36.247	1.00	0.00	C
11	ATOM	11	C11	LIG	A	1	-7.070	22.803	35.986	1.00	0.00	C
12	ATOM	12	C12	LIG	A	1	-6.765	22.207	36.468	1.00	0.00	C
13	ATOM	13	C13	LIG	A	1	-7.211	21.918	37.099	1.00	0.00	C
14	ATOM	14	C14	LIG	A	1	-6.851	21.773	37.827	1.00	0.00	C
15	ATOM	15	O1	LIG	A	1	-6.316	22.180	38.304	1.00	0.00	O
16	ATOM	16	C15	LIG	A	1	-6.342	21.567	38.856	1.00	0.00	C
17	ATOM	17	O2	LIG	A	1	-5.982	21.422	39.584	1.00	0.00	O
18	ATOM	18	C16	LIG	A	1	-6.878	21.160	38.379	1.00	0.00	C
19	ATOM	19	C17	LIG	A	1	-7.275	20.439	38.431	1.00	0.00	C
20	ATOM	20	C18	LIG	A	1	-7.270	20.016	39.140	1.00	0.00	C
21	ATOM	21	C19	LIG	A	1	-7.668	19.295	39.193	1.00	0.00	C
22	ATOM	22	C20	LIG	A	1	-7.669	18.876	39.903	1.00	0.00	C
23	ATOM	23	C21	LIG	A	1	-7.999	18.120	39.936	1.00	0.00	C
24	ATOM	24	C22	LIG	A	1	-8.000	17.701	40.646	1.00	0.00	C
25	ATOM	25	O3	LIG	A	1	-6.014	21.900	36.320	1.00	0.00	O
26	ATOM	26	C23	LIG	A	1	-5.813	21.652	35.559	1.00	0.00	C

Fonte: Autoria própria

Figura 6 - Estrutura do arquivo .pdb para a proteína 3HRH (Ag85c)



1	ATOM	1	N	PRO	A	1	91.180	64.520	55.630	1.00	0.00	N
2	ATOM	2	HN1	PRO	A	1	91.050	65.510	55.450	1.00	0.00	H
3	ATOM	3	HN2	PRO	A	1	92.110	64.270	55.340	1.00	0.00	H
4	ATOM	4	CD	PRO	A	1	90.940	64.170	57.070	1.00	0.00	C
5	ATOM	5	HD1	PRO	A	1	91.510	63.340	57.550	1.00	0.00	H
6	ATOM	6	HD2	PRO	A	1	91.370	65.030	57.610	1.00	0.00	H
7	ATOM	7	CA	PRO	A	1	90.190	63.750	54.790	1.00	0.00	C
8	ATOM	8	HA	PRO	A	1	90.690	63.040	54.150	1.00	0.00	H
9	ATOM	9	CB	PRO	A	1	89.220	63.100	55.830	1.00	0.00	C
10	ATOM	10	HB1	PRO	A	1	89.440	62.020	55.940	1.00	0.00	H
11	ATOM	11	HB2	PRO	A	1	88.170	63.060	55.470	1.00	0.00	H
12	ATOM	12	CG	PRO	A	1	89.460	63.800	57.140	1.00	0.00	C
13	ATOM	13	HG1	PRO	A	1	89.400	63.270	58.110	1.00	0.00	H
14	ATOM	14	HG2	PRO	A	1	88.800	64.680	57.050	1.00	0.00	H
15	ATOM	15	C	PRO	A	1	89.490	64.820	53.900	1.00	0.00	C
16	ATOM	16	O	PRO	A	1	89.190	65.900	54.420	1.00	0.00	O
17	ATOM	17	N	VAL	A	2	89.200	64.490	52.630	1.00	0.00	N
18	ATOM	18	HN	VAL	A	2	89.420	63.590	52.240	1.00	0.00	H
19	ATOM	19	CA	VAL	A	2	88.480	65.400	51.750	1.00	0.00	C
20	ATOM	20	HA	VAL	A	2	88.210	66.270	52.330	1.00	0.00	H
21	ATOM	21	CB	VAL	A	2	89.200	65.580	50.430	1.00	0.00	C
22	ATOM	22	HB	VAL	A	2	89.490	64.600	50.010	1.00	0.00	H
23	ATOM	23	CG1	VAL	A	2	88.360	66.400	49.430	1.00	0.00	C
24	ATOM	24	HG11	VAL	A	2	88.830	66.530	48.430	1.00	0.00	H
25	ATOM	25	HG12	VAL	A	2	87.360	65.950	49.280	1.00	0.00	H
26	ATOM	26	HG13	VAL	A	2	88.250	67.400	49.900	1.00	0.00	H

Fonte: Autoria própria.

Apesar de todos esses arquivos obtidos até o momento serem importantes eles ainda não têm todas as informações necessárias para que seja realizada uma Dinâmica Molecular (MD), pois eles não levam em consideração os parâmetros de força e interações decorrentes de um campo de força. Para isso são necessários arquivos de topologia em formato .top ou .itp para o alvo e o ligante. Neste caso, como foram empregados o GROMACS e o campo de força CHARMM, a melhor ferramenta para essa finalidade é o SwissParam (<http://www.swissparam.ch/>) (ZOETE et al., 2011) para a topologia do ligante. Para as proteínas, o GROMACS possui sua própria ferramenta para gerar os arquivos de topologia (ABRAHAM et al., 2024), como demonstrado na Figura 7.

Figura 7 -- Linha de comando GROMACS

```
gmx pdb2gmx -f REC.pdb -ignh
```

Fonte: Autoria própria. * gmx pdb2gmx - pacote utilizado para converter um arquivo PDB em arquivos de topologia e coordenadas no formato GROMACS; -f REC.pdb: Arquivo de entrada; -ignh: Ignora os átomos de hidrogênio presentes no arquivo PDB original.

Ao executar o comando, o prompt solicita inicialmente a escolha do campo de força a ser utilizado, um passo fundamental para definir os parâmetros que coordenarão as interações moleculares durante a simulação. Em seguida, é solicitado o modelo de água, onde optamos pelo TIP3P, um dos modelos mais comumente utilizados devido ao seu equilíbrio entre precisão e eficiência computacional. Com estas escolhas feitas, o GROMACS gera dois arquivos essenciais: o arquivo de estrutura .gro para a molécula e o arquivo de topologia .top.

Após a obtenção desses arquivos, a próxima etapa envolve a combinação manual dos arquivos .gro da proteína (conf.gro) (Figura 8) e do ligante (lig.gro) em um único arquivo, representando o complexo ligante-receptor. Isso é realizado abrindo ambos os arquivos em um editor de texto e inserindo as coordenadas do ligante ao final do arquivo da proteína. É essencial atualizar o cabeçalho do arquivo para refletir o novo número total de átomos no sistema. Essa etapa garante que o GROMACS reconheça o complexo completo durante a simulação.

Figura 8 - Arquivo conf.gro.

```

1 Guyana Rwanda Oman Macau Angola Cameroon Senegal
2 4244
3 1PRO N 1 -0.664 0.806 6.254
4 1PRO HN1 2 -0.667 0.902 6.226
5 1PRO HN2 3 -0.571 0.770 6.243

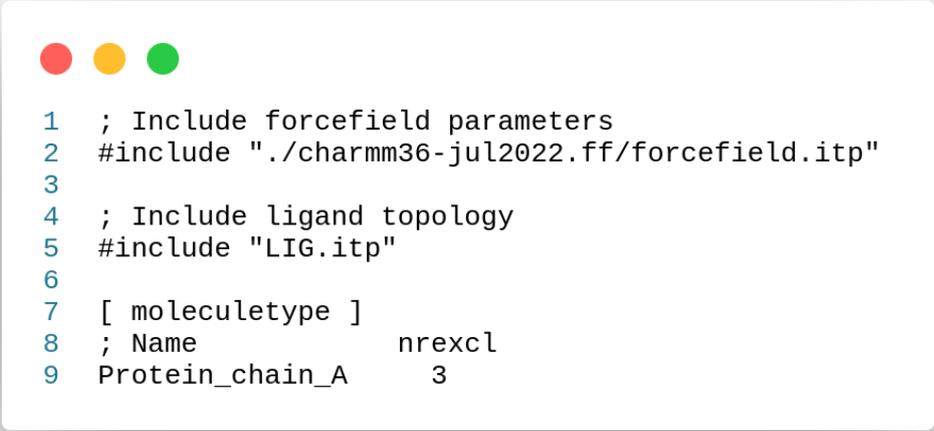
1 276GLY C 4154 -0.362 3.029 6.994
2 276GLY OT1 4155 -0.338 2.896 6.981
3 276GLY OT2 4156 -0.294 3.115 7.074
4 1LIG C1 1 -1.146 2.836 3.508
5 1LIG C2 2 -1.127 2.767 3.549

```

Fonte: Autoria própria. Observar a linha nº 2 onde deve ser adicionado quantas linhas novas referente ao ligante estão sendo inseridas, e também ilustrando o último aminoácido da enzima, onde posteriormente foram adicionadas as linhas referentes ao ligante.

A seguir, os arquivos de topologia foram unificados (Figura 9). A topologia do ligante precisa ser adicionada ao arquivo de topologia da proteína, assegurando que todas as interações e parâmetros moleculares sejam corretamente definidos para o sistema combinado. Esse passo é vital para garantir que as interações entre o ligante e o receptor sejam tratadas corretamente durante a simulação.

Figura 9 - Adição da topologia no arquivo topol.top



```
1 ; Include forcefield parameters
2 #include "../charmm36-jul2022.ff/forcefield.itp"
3
4 ; Include ligand topology
5 #include "LIG.itp"
6
7 [ moleculetype ]
8 ; Name          nrexcl
9 Protein_chain_A 3
```

Fonte: Autoria própria.

Toda a combinação de estrutura e topologia realizados são um ponto relevante devido ao serem realizadas de forma manual, portanto as chances de falha humana existem e caso aconteçam podem impedir que a MD ocorra, ou que resultados inadequados aconteçam, portanto a precisão nesta fase tem um impacto significativo na qualidade e na confiabilidade dos resultados da simulação, destacando a importância de uma montagem cuidadosa e detalhada do sistema.

4.7. Solvatação

Para solvatar o sistema, o primeiro passo é definir o volume que acomoda a caixa d'água correspondente ao sistema, onde o formato da caixa é crucial para garantir uma solvatação eficiente e minimização de artefatos durante a simulação. Neste caso, optamos por uma caixa dodecaédrica, preferido devido às suas características geométricas; um dodecaedro tem 12 faces pentagonais, que proporcionam um formato mais arredondado em comparação com caixas cúbicas ou ortogonais. Essa geometria arredondada é vantajosa porque reduz as chances de colisão entre as moléculas da simulação e as bordas da caixa, o que pode introduzir artefatos indesejados nas dinâmicas moleculares, além de sua forma mais arredondada, a caixa dodecaédrica também permite uma utilização mais eficiente do espaço ao redor do sistema.

Uma vez definido o formato e o tamanho da caixa, utilizamos o comando específico no GROMACS (Figura 10) para gerar essa configuração (ABRAHAM et al., 2024).

Figura 10 – Linha de comando gmx editconf

```
gmx editconf -f conf.gro -d 3.0 -bt dodecahedron -o box.gro
```

Fonte: Autoria própria. *-f conf.gro: Especifica o arquivo de entrada contendo as coordenadas do sistema; -d 3.0: Define a distância mínima de 3.0 nm entre a borda do sistema e a caixa de simulação; -bt dodecahedron: Especifica o formato da caixa de simulação como dodecaédrico; -o box.gro: Arquivo de saída contendo o sistema configurado dentro da nova caixa.

Para solvatar o sistema utilizamos o comando gmx solvate (Figura 11) (ABRAHAM et al., 2024).

Figura 11 – Linha de comando gmx solvate

```
gmx solvate -cp box.gro -cs spc216.gro -p topol.top -o box_solv.gro
```

Fonte: Autoria própria. *-cp box.gro: Arquivo de entrada contendo as coordenadas do sistema configurado na caixa; -cs spc216.gro: Arquivo de coordenadas do solvente padrão; -p topol.top: Arquivo de topologia do sistema, que será atualizado para incluir as moléculas de solvente adicionadas; -o box_solv.gro: Arquivo de saída contendo o sistema solvatado.

4.8. Neutralização e adição de íons

O GROMACS possui um módulo interno dedicado à adição de íons ao sistema (Figuras 12 e 13). Esse módulo permite aos usuários definirem a concentração molar dos íons no sistema, ajustando a quantidade de cátions e ânions conforme necessários para refletir as condições experimentais ou fisiológicas desejadas. A capacidade de ajustar precisamente a concentração iônica é importante para garantir que o ambiente simulado seja o mais realista possível, influenciando diretamente as interações moleculares e a estabilidade do sistema (ABRAHAM et al., 2024).

Figura 12 - Adição de íons no GROMACS

```
gmx grompp -f ions.mdp -c box_solv.gro -maxwarn 2 -p topol.top -o ION.tpr
```

Fonte: Autoria própria. *gmx grompp; -f ions.mdp: Especifica o arquivo de entrada contendo os parâmetros para a adição de íons; -c box_solv.gro: Arquivo de coordenadas do sistema já solvatado; -maxwarn 2: Permite até dois avisos durante o processamento; -p topol.top: Arquivo de topologia do sistema; -o ION.tpr: Arquivo de saída que contém as informações preparadas para a adição de íons.

Figura 13 - Equilíbrio iônico

```
gmx genion -s ION.tpr -p topol.top -conc 0.1 -neutral -o box_solv_ion.gro
```

15

Fonte: Autoria própria. * gmx genion: Utilitário do GROMACS para adicionar íons ao sistema; -s ION.tpr: Arquivo de entrada preparado pelo comando grompp; -p topol.top: Arquivo de topologia do sistema, que será atualizado para incluir os íons adicionados; -conc 0.1: Define a concentração de íons no sistema para 0.1 M; -neutral: Adiciona íons para neutralizar a carga total do sistema; -o box_solv_ion.gro: Arquivo de saída contendo o sistema solvatado e com íons adicionados; 15: Indica o grupo de solvente ao qual os íons serão adicionados, geralmente especificado interativamente durante a execução do comando.

4.9. Minimização

A minimização é uma etapa fundamental, pois antes de se iniciar uma MD é essencial remover qualquer tensão ou sobreposição que possa existir na estrutura inicial para evitar problemas ou resultados inadequados. Nesse processo o sistema é ajustado para encontrar um estado energia potencial mais baixo, ajustando as posições dos átomos iterativamente para reduzir as forças não balanceadas e eliminar possíveis colapsos ou deformações estruturais, levando em consideração que o sistema esteja em uma configuração estável e fisicamente realista, sendo assim um ponto de partida ideal para simulações de dinâmica subsequentes (LEVITT, 1983)

Além de preparar o sistema para MD, a minimização também pode ser usada para otimizar estruturas moleculares após modificações, como mutações em proteínas ou adição de ligantes, sendo um passo essencial para garantir que mudanças introduzidas não resultem em conformações desfavoráveis que possam comprometer a estabilidade do sistema durante a dinâmica (LEVITT, 1983).

No GROMACS é necessário um arquivo de entrada com parâmetros determinados e sendo necessário o ajuste dos valores ou inclusão de novas medidas a depender do sistema em particular, e o tempo para que a minimização aconteça de forma eficiente varia de acordo com o sistema. Para realizar a minimização é necessário criar um arquivo de entrada como o exemplo da Figura 14.

Figura 14 - Arquivo de entrada para minimização com comentários em cada linha

```
1 ; LINES STARTING WITH ';' ARE COMMENTS
2 title = Minimization ; Title of run
3
4 ; Parameters describing what to do, when to stop and what to save
5 integrator = steep ; Algorithm (steep = steepest descent minimization)
6 emtol = 1000.0 ; Stop minimization when the maximum force < 10.0 kJ/mol
7 emstep = 0.01 ; Energy step size
8 nsteps = 50000 ; Maximum number of (minimization) steps to perform
9
10 ; Parameters describing how to find the neighbors of each atom and how to calculate the interactions
11 nstlist = 1 ; Frequency to update the neighbor list and long range forces
12 cutoff-scheme = Verlet
13 ns_type = grid ; Method to determine neighbor list (simple, grid)
14 rlist = 1.2 ; Cut-off for making neighbor list (short range forces)
15 coulombtype = PME ; Treatment of long range electrostatic interactions
16 rcoulomb = 1.2 ; long range electrostatic cut-off
17 vdwtype = cutoff
18 vdw-modifier = force-switch
19 rvdw-switch = 1.0
20 rvdw = 1.2 ; long range Van der Waals cut-off
21 pbc = xyz ; Periodic Boundary Conditions
22 DispCorr = no
23
```

Fonte: Autoria própria.

O processo de minimização inicia utilizando o mesmo comando `gmx grompp`, com o código demonstrado na Figura 15 (ABRAHAM et al., 2024).

Figura 15 - Minimização de energia

```
gmx grompp -f EM.mdp -c box_solv_ion.gro -maxwarn 2 -p topol.top -o EM.tpr
```

Fonte: Autoria própria. *`gmx grompp`: GROMACS preprocessor, `-f EM.mdp`: Especifica que será inserido um arquivo de parâmetros de minimização e o nome do arquivo; `-c box_solv_ion.gro`: Arquivo de coordenadas do sistema solvatado; `-p topol.top`: Arquivo de topologia; `-maxwarn 2`: Permite até dois avisos durante o processamento; `-o EM.tpr`: Resultado do código executado.

Com isso temos tudo o que é necessário para realizar a minimização de energia, bastando executar o comando (Figura 16) (ABRAHAM et al., 2024).

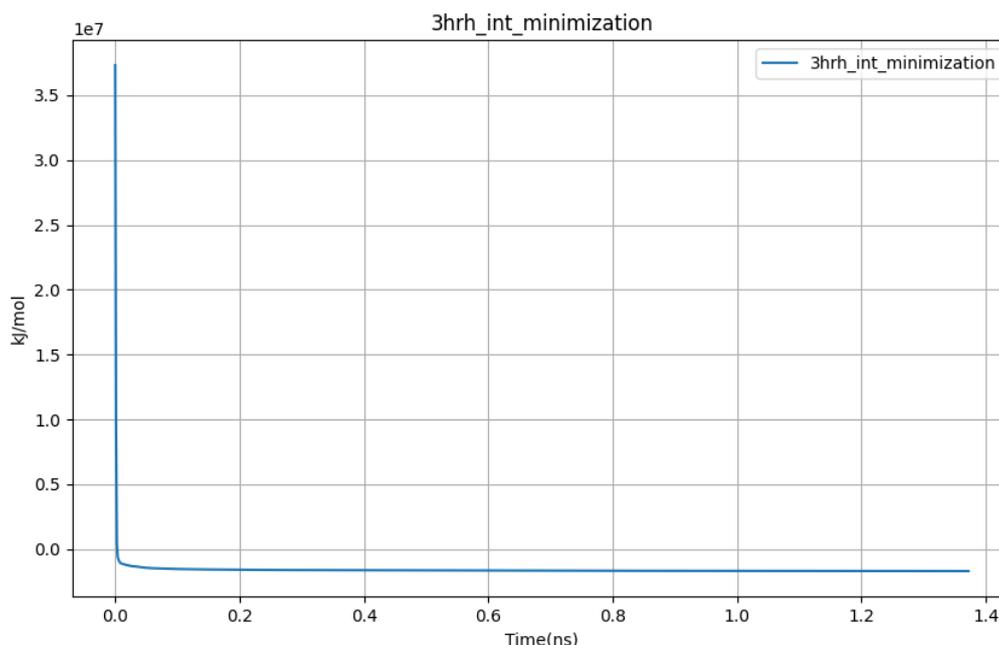
Figura 16 - Dinâmica para minimização

```
gmx mdrun -v -deffnm EM
```

Fonte: Autoria própria. *`gmx mdrun`: Utilitário do GROMACS para executar a simulação de dinâmica molecular. `-v`: Ativa a saída detalhada de informações durante a execução, permitindo monitorar o progresso da simulação. `-deffnm EM`: Define o nome base para os arquivos de entrada e saída gerados pelo `mdrun`. Neste caso, o prefixo "EM" será usado para todos os arquivos relacionados à execução da minimização de energia.

Para avaliar o sucesso de uma minimização (Figura 17) dois fatores são fundamentais, a energia potencial deve ser negativa e a força máxima não deve ultrapassar o valor mínimo definido no arquivo de entrada.

Figura 17 - Gráfico do potencial em kJ/mol para minimização do sistema



Fonte: Autoria própria.

4.10. Equilíbrio do sistema - parte 1

- Restrição do ligante

O GROMACS permite a criação de grupos personalizados com o formato de arquivo `.ndx`, permitindo que o usuário gere conjuntos de átomos de forma flexível além dos pré-definidos nos arquivos padrão de coordenadas ou topologia. Os conjuntos pré-determinados geralmente são solvente, proteína, ligante, etc. Por meio do comando `'gmx make_ndx'` (Figura 18) podemos selecionar os átomos com base em diversos critérios, como tipo de átomo, resíduo ou localização espacial (ABRAHAM et al., 2024).

Figura 18 - Arquivo ndx de restrição do ligante

```
gmx make_ndx -f LIG.gro -o index_LIG.ndx
```

Fonte: Autoria própria. `*gmx make_ndx`: Pacote GROMACS responsável por gerar os arquivos `.ndx`; `-f LIG.gro`: Vai gerar o conjunto personalizado com base no arquivo informado; `-o index_LIG.ndx`: Nome do arquivo que terá o conjunto personalizado.

Ao executar o comando o prompt interativo do GROMACS será aberto (Figura 19) solicitando as informações necessárias para se gerar o conjunto desejado:

Figura 19 - Exemplo do prompt interativo

```

:-) GROMACS - gmx make_ndx, 2024.1 (-:
Executable: /usr/local/gromacs/bin/gmx
Data prefix: /usr/local/gromacs
Working dir: /home/insilitox/Documentos/Ag85c_TCC/3hrh_orlistat_inteiro/Ag85c_THL_dodecahedron_3.0
Command line:
  gmx make_ndx -f LIG.gro -o test.ndx

Reading structure file
Going to read 0 old index file(s)
Analysing residue names:
There are:      1      Other residues
Analysing residues not classified as Protein/DNA/RNA/Water and splitting into groups...

  0 System          :      88 atoms
  1 Other           :      88 atoms
  2 LIG             :      88 atoms

nr : group      '!' : not 'name' nr name  'splitch' nr   Enter: list groups
'a': atom       '&' : and 'del' nr   'splitres' nr  'l': list residues
't': atom type  '|' : or  'keep' nr   'splitat' nr   'h': help
'r': residue    'res' nr   'chain' char
"name": group   'case': case sensitive  'q': save and quit
'ri': residue index

> █

```

Fonte: Autoria própria.

Para obter um conjunto personalizado com todos os átomos exceto os hidrogênios, basta seguir o exemplo da Figura 20.

Figura 20 - Conjunto personalizado

```

0 & ! a H*

q

```

Fonte: Autoria própria.

Na sequência é necessário restringir a posição do ligante e dos átomos selecionados no arquivo .ndx. Este processo pode ser realizado através do comando gmx genrestr (Figura 21)(ABRAHAM et al., 2024).

Figura 21 - Geração da restrição

```
gmx genrestr -f LIG.gro -n index_LIG.ndx -o posre_LIG.itp -fc 1000 1000 1000
```

Fonte: Autoria própria. * gmx genrestr: Módulo do GROMACS capaz de gerar as restrições, -f LIG.gro e -n index_LIG.ndx: Restrições com base nos arquivos selecionados, -o posre_LIG.itp: Arquivo de restrição que será gerado, -fc 1000 1000 1000: Força de restrição nas direções x, y e z.

Com a execução deste comando será aberto um prompt interativo solicitando o conjunto que deverá ser restringido (Figura 22). Para o nosso estudo selecionamos a opção 3.

Figura 22 - Prompt interativo do comando de restrição

```
Executable: /usr/local/gromacs/bin/gmx
Data prefix: /usr/local/gromacs
Working dir: /home/insilitox/Documents/Ag85c_TCC/3hrh_orlistat_inteiro/Ag85c_THL_dodecahedron_3.0
Command line:
  gmx genrestr -f LIG.gro -n index_LIG.ndx -o posre_LIG.itp -fc 1000 1000 1000

Reading structure file
Select group to position restrain
Group  0 (      System) has  88 elements
Group  1 (      Other) has  88 elements
Group  2 (      LIG) has  88 elements
Group  3 (  System_&!H*) has  35 elements
```

Fonte: Autoria própria.

Para inserir o arquivo de restrição criado na topologia (Figura 23) o arquivo topol.top deve ser editado para que o GROMACS possa interpretar.

Figura 23 - Exemplo de onde deve ser inserido a configuração de restrição no código, logo abaixo do trecho de “include position restraint file”

```

1  ; Include Position restraint file
2  #ifdef POSRES
3  #include "posre.itp"
4  #endif
5
6  ; Ligand position restraints
7  #ifdef POSRES
8  #include "posre_LIG.itp"
9  #endif
10
11 ; Include water topology
12 #include "../charmm36-jul2022.ff/tip3p.itp"
```

Fonte: Autoria própria.

- Termostatos

Os termostatos são importantes para manter a temperatura do sistema equilibrada, controlando flutuações de energia para garantir que a temperatura seja estável ao longo de toda a simulação, pois suas oscilações influenciam diretamente nas propriedades do sistema.

Para obter resultados estáveis é recomendável agrupar moléculas semelhantes para o acoplamento da temperatura, como por exemplo agrupar a proteína e o ligante juntos em um único grupo de termostato, e agrupar água e íons em outro grupo (Figura 24). O acoplamento de cada molécula individualmente a um termostato pode desestabilizar o sistema, causando flutuações extremas de temperatura que podem levar à quebra do sistema. Novamente, podemos fazer o outro agrupamento por meio do módulo 'make_ndx' do GROMACS (ABRAHAM et al., 2024).

Figura 24 - Arquivo ndx com índice personalizado

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

```
1 | 13
```

```
q
```

Fonte: Autoria própria. * gmx make_ndx: Cria um arquivo de índice; 1 | 13: Seleciona e combina os grupos 1 (protein) e 13 (LIG) no prompt interativo; q: Saída do prompt interativo

4.11. Equilíbrio do sistema - parte 2

Para que o sistema alcance o equilíbrio esperado, onde todas as forças internas e externas estão balanceadas e estabilizadas, existe uma etapa que ainda deve ser executada, que é a execução de simulações NVT (Número de partículas, Volume e Temperatura) e NPT (Número de partículas, Pressão e Temperatura). Essas funções termodinâmicas são essenciais para ajustar as condições iniciais do sistema, garantindo que ele inicie em um estado termodinamicamente estável e representativo das condições biológicas ou químicas desejadas. Dessa forma a precisão dos resultados alcançados será de maior similaridade com o real, permitindo que seja

analisado o sistema de interesse sob condições termodinâmicas realistas, além de reduzir artefatos causados por condições iniciais inadequadas.

Para que isso seja feito devemos novamente criar um arquivo de entrada, tanto para NVT e para NPT (Figura 25):

Figura 25 - Arquivo NPT.mdp utilizado

```

1 title = Protein-ligand complex NPT equilibration
2 define = -DPOSRES ; position restrain the protein and ligand
3 ; Run parameters
4 integrator = md ; leap-frog integrator
5 nsteps = 50000 ; 2 * 50000 = 100 ps
6 dt = 0.002 ; 2 fs
7 ; Output control
8 nstenergy = 500 ; save energies every 1.0 ps
9 nstlog = 500 ; update log file every 1.0 ps
10 nstxout-compressed = 500 ; save coordinates every 1.0 ps
11 ; Bond parameters
12 continuation = yes ; continuing from NVT
13 constraint_algorithm = lincs ; holonomic constraints
14 constraints = h-bonds ; bonds to H are constrained
15 lincs_iter = 1 ; accuracy of LINCS
16 lincs_order = 4 ; also related to accuracy
17 ; Neighbor searching and vdW
18 cutoff-scheme = Verlet
19 ns_type = grid ; search neighboring grid cells
20 nstlist = 20 ; largely irrelevant with Verlet
21 rlist = 1.2
22 vdwtype = cutoff
23 vdw-modifier = force-switch
24 rvdw-switch = 1.0
25 rvdw = 1.2 ; short-range van der Waals cutoff (in nm)
26 ; Electrostatics
27 coulombtype = PME ; Particle Mesh Ewald for long-range electrostatics
28 rcoulomb = 1.2
29 pme_order = 4 ; cubic interpolation
30 fourierspacing = 0.16 ; grid spacing for FFT
31 ; Temperature coupling
32 tcoupl = V-rescale ; modified Berendsen thermostat
33 tc-grps = Protein_LIG Water_and_ions ; two coupling groups - more accurate
34 tau_t = 0.1 0.1 ; time constant, in ps
35 ref_t = 300 300 ; reference temperature, one for each group, in K
36 ; Pressure coupling
37 pcoupl = Berendsen ; pressure coupling is on for NPT
38 pcoupltype = isotropic ; uniform scaling of box vectors
39 tau_p = 2.0 ; time constant, in ps
40 ref_p = 1.0 ; reference pressure, in bar
41 compressibility = 4.5e-5 ; isothermal compressibility of water, bar^-1
42 refcoord_scaling = com
43 ; Periodic boundary conditions
44 pbc = xyz ; 3-D PBC
45 ; Dispersion correction is not used for proteins with the C36 additive FF
46 DispCorr = no
47 ; Velocity generation
48 gen_vel = no ; velocity generation off after NVT

```

Fonte: Autoria própria. Verifica-se que o equilíbrio ocorrerá por 100ps (linha 5), a 300K (linha 35)

Com os arquivos prontos pode-se gerar o par de equilíbrios NVT/NPT (Figuras 26 a 29)(ABRAHAM et al., 2024).

Figura 26 - Arquivo de entrada para NVT

```
gmx grompp -f NVT.mdp -c EM.gro -r EM.gro -p topol.top -n index.ndx -maxwarn 2 -o NVT.tpr
```

Fonte: Autoria própria. *gmx grompp: GROMACS preprocessor; prepara o sistema para a execução de dinâmicas moleculares ou outros cálculos; -f NVT.mdp: Especifica o arquivo de entrada contendo os parâmetros para a simulação de equilíbrio NVT (Número de partículas, Volume e Temperatura constantes); -c EM.gro: Arquivo de coordenadas do sistema após a minimização de energia; -r EM.gro: Arquivo de coordenadas de referência, usado para restrições de posição durante a fase de equilíbrio; -p topol.top: Arquivo de topologia do sistema; -n index.ndx: Arquivo de índice que contém definições personalizadas de grupos de átomos para a simulação; -maxwarn 2: Permite até dois avisos durante o processamento; -o NVT.tpr: Arquivo de saída que contém as informações preparadas para a execução da simulação de equilíbrio NVT.

Figura 27 - Dinâmica NVT

```
gmx mdrun -deffnm NVT
```

Fonte: Autoria própria. *gmx mdrun: Utilitário do GROMACS para executar a simulação de dinâmica molecular; -deffnm NVT: Define o nome base para os arquivos de entrada e saída gerados pelo mdrun. Neste caso, o prefixo "NVT" será usado para todos os arquivos relacionados à execução da simulação de equilíbrio NVT (Número de partículas, Volume e Temperatura constantes)

Figura 28 - Arquivo de entrada NPT

```
gmx grompp -f NPT.mdp -c NVT.gro -r NVT.gro -p topol.top -n index.ndx -maxwarn 2 -o NPT.tpr
```

Fonte: Autoria própria. *gmx grompp: GROMACS preprocessor; prepara o sistema para a execução de dinâmicas moleculares ou outros cálculos; -f NPT.mdp: Especifica o arquivo de entrada contendo os parâmetros para a simulação de equilíbrio NPT (Número de partículas, Pressão e Temperatura constantes); -c NVT.gro: Arquivo de coordenadas do sistema após a simulação de equilíbrio NVT; -r NVT.gro: Arquivo de coordenadas de referência, usado para restrições de posição durante a fase de equilíbrio NPT; -p topol.top: Arquivo de topologia do sistema; -n index.ndx: Arquivo de índice que contém definições personalizadas de grupos de átomos para a simulação; -maxwarn 2: Permite até dois avisos durante o processamento. -o NPT.tpr: Arquivo de saída que contém as informações preparadas para a execução da simulação de equilíbrio NPT.

Figura 29 - Dinâmica NPT

```
gmx mdrun -deffnm NPT
```

Fonte: Autoria própria. *gmx mdrun: Utilitário do GROMACS para executar a simulação de dinâmica molecular; -deffnm NPT: Define o nome base para os arquivos de entrada e saída gerados pelo mdrun

4.12. Dinâmica molecular

A etapa final é a própria dinâmica molecular. Durante a MD o GROMACS integra equações de movimento de Newton para todos os átomos do sistema usando algoritmos eficientes como o de Verlet (VERLET, 1967), integração realizada em pequenos incrementos de tempo chamados de “passos de tempo”, geralmente na ordem de femtossegundos.

A dinâmica tem como principal objetivo investigar fenômenos que dependem do tempo, como flexibilidade estrutural das proteínas, mecanismos de interação molecular, difusão de moléculas pequenas em solventes e mudanças conformacionais induzidas por ligantes. Também pode ser utilizada para validar hipóteses experimentais e prever comportamentos moleculares que não ocorreram experimentalmente, como simular como uma mutação pode afetar a estabilidade de uma proteína.

Assim como nos passos de equilíbrio, também é necessário um arquivo de entrada (Figura 30). No total foram realizadas 6 dinâmicas de 100ns cada. 3 utilizando a proteína 3HRH (uma com a proteína “apo”, uma com a THL íntegra e outra com a THL hidrolisada) e 3 utilizando a proteína 5VNS (uma com a proteína “apo”, e duas com a THL hidrolisada - uma contendo água no sítio catalítico e uma sem água).

Figura 30 - Arquivo de entrada para MD

```

1 title = Protein-ligand complex MD simulation
2 ; Run parameters
3 integrator = md ; leap-frog integrator
4 nsteps = 50000000 ; 2 * 5000000 = 100000 ps (100 ns)
5 dt = 0.002 ; 2 fs
6 ; Output control
7 nstenergy = 5000 ; save energies every 10.0 ps
8 nstlog = 5000 ; update log file every 10.0 ps
9 nstxout-compressed = 5000 ; save coordinates every 10.0 ps
10 ; Bond parameters
11 continuation = yes ; continuing from NPT
12 constraint_algorithm = lincs ; holonomic constraints
13 constraints = h-bonds ; bonds to H are constrained
14 lincs_iter = 1 ; accuracy of LINCS
15 lincs_order = 4 ; also related to accuracy
16 ; Neighbor searching and vdw
17 cutoff-scheme = Verlet
18 ns_type = grid ; search neighboring grid cells
19 nstlist = 20 ; largely irrelevant with Verlet
20 rlist = 1.2
21 vdwtype = cutoff
22 vdw-modifier = force-switch
23 rvdw-switch = 1.0
24 rvdw = 1.2 ; short-range van der Waals cutoff (in nm)
25 ; Electrostatics
26 coulombtype = PME ; Particle Mesh Ewald for long-range electrostatics
27 rcoulomb = 1.2
28 pme_order = 4 ; cubic interpolation
29 fourierspacing = 0.16 ; grid spacing for FFT
30 ; Temperature coupling
31 tcoupl = V-rescale ; modified Berendsen thermostat
32 tc-grps = Protein_LIG Water_and_ions ; two coupling groups - more accurate
33 tau_t = 0.1 0.1 ; time constant, in ps
34 ref_t = 300 300 ; reference temperature, one for each group, in K
35 ; Pressure coupling
36 pcoupl = Parrinello-Rahman ; pressure coupling is on for NPT
37 pcoupltype = isotropic ; uniform scaling of box vectors
38 tau_p = 2.0 ; time constant, in ps
39 ref_p = 1.0 ; reference pressure, in bar
40 compressibility = 4.5e-5 ; isothermal compressibility of water, bar^-1
41 ; Periodic boundary conditions
42 pbc = xyz ; 3-D PBC
43 ; Dispersion correction is not used for proteins with the C36 additive FF
44 DispCorr = no
45 ; Velocity generation
46 gen_vel = no ; continuing from NPT equilibration

```

Fonte: Autoria própria. Tempo da dinâmica definido em 100ns (Linha 4).

Com os dados prontos é possível executar a dinâmica como demonstrado na Figura 31 (ABRAHAM et al., 2024).

Figura 31 - Dinâmica molecular

```
gmx grompp -f MD.mdp -c NPT.gro -t NPT.cpt -p topol.top -n index.ndx -maxwarn 2 -o MD.tpr
```

```
gmx mdrun -deffnm MD
```

Fonte: Autoria própria.

4.13. Cálculos utilizando GROMACS

4.13.1. Seleção de aminoácidos

Utilizando a metodologia anterior do GROMACS para a geração dos arquivos .ndx, os aminoácidos Ser124, Met125, Ser148, Phe150, Leu161, Thr213, Pro223, Phe226, Leu227, Glu228 e His260 foram selecionados com base na proteína cristalizada 5VNS disponível no PDB e suas interações com a THL. Esses arquivos .ndx são então integrados ao fluxo de trabalho da simulação, possibilitando análises detalhadas e a aplicação de restrições ou condições específicas durante a dinâmica molecular, contribuindo para uma compreensão mais profunda das interações moleculares estudadas.

- RMSD

RMSD (Figura 32), sigla para *Root Mean Square Deviation*, ou raiz quadrada do desvio quadrático, é uma medida quantitativa da diferença média das posições atômicas de uma molécula ou conjunto de estruturas definidos em relação a outro ao longo do tempo, sendo amplamente utilizado para avaliar a estabilidade estrutural e conformação de biomoléculas durante a simulação. Um baixo valor de RMSD significa que a estrutura permanece estável e próxima da sua conformação inicial, enquanto o aumento pode indicar instabilidade estrutural ou mudanças conformacionais (ABRAHAM et al., 2024).

Figura 32 - Equação para cálculo de RMSD

$$RMSD = \sqrt{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (x_{i1} - x_{i2})^2 + (y_{i1} - y_{i2})^2 + (z_{i1} - z_{i2})^2}$$

Fonte: (“RMSD e RMSF – OnlineBioinfo”, 2022). $\frac{1}{n}$: Este termo representa a divisão por n , onde n é o número total de pontos ou coordenadas que estão sendo comparados; X_{i1} , Y_{i1} e Z_{i1} são coordenadas em 3D dos átomos para o primeiro conjunto de moléculas; X_{i2} , Y_{i2} e Z_{i2} para o segundo conjunto de moléculas.

O cálculo do RMSD dentro do GROMACS é possível, após a execução da MD, através do comando demonstrado na Figura 33.

Figura 33 - Comando para cálculo de RMSD

```
gmx rms -s MD.tpr -f MD_center.xtc -o rmsd.xvg -tu ns
```

Fonte: Autoria própria. *gmx rms: Comando do GROMACS para calcular RMSD (Root Mean Square Deviation); -s MD.tpr: Arquivo de entrada .tpr contendo a topologia e parâmetros da simulação; -f MD_center.xtc: Arquivo de trajetória .xtc com as coordenadas atômicas ao longo do tempo; -o rmsd.xvg: Arquivo de saída onde o RMSD será salvo, em formato .xvg; -tu ns: Unidade de tempo para o cálculo do RMSD, aqui definido como nanossegundos (ns).

- RMSF

RMSF (Figura 34), sigla para *Root Mean Square Fluctuation*, ou desvio quadrático médio de flutuação é uma medida da flutuação de cada resíduo ou átomo em torno da sua posição média ao longo do tempo, indicando assim regiões de flexibilidade ou rigidez da molécula, portanto menores valores indicam uma região de estabilidade e rígida como hélices alfa e folhas beta, enquanto valores altos indicam regiões com alta mobilidade, como loops ou terminais de proteínas. Sua análise é fundamental para entendimento de domínios de estabilidade e a importância funcional de regiões flexíveis em processos como a ligação de ligantes ou ativação enzimática (ABRAHAM et al., 2024).

Figura 34 - Fórmula para cálculo de RMSF

$$RMSF_{\text{átomo}} = \sqrt{\frac{1}{t} \sum_{i=1}^t (x_i^{\text{ref}} - x_i)^2 + (y_i^{\text{ref}} - y_i)^2 + (z_i^{\text{ref}} - z_i)^2}$$

Fonte: (“RMSD e RMSF – OnlineBioinfo”, 2022). $\frac{1}{n}$: Este termo representa a divisão por n , onde n é o número total de pontos ou coordenadas que estão sendo comparados; X_i, Y_i e Z_i são coordenadas em 3D dos átomos para o primeiro conjunto de moléculas; X_i, Y_i e Z_i para o segundo conjunto de moléculas; ref: referência ou a posição média de um átomo ou grupo de átomos ao longo de uma simulação de dinâmica molecular.

O cálculo do RMSD dentro do GROMACS é possível, após a execução da MD, através do comando demonstrado na Figura 35.

Figura 35 - Comando para cálculo de RMSF

```
gmx rmsf -s MD.tpr -f MD_center.xtc -o rmsf.xvg
```

Fonte: Autoria própria. *gmx rmsf: Comando para calcular o RMSF; -s MD.tpr: Arquivo .tpr de entrada com a topologia e parâmetros da simulação; -f MD_center.xtc: Arquivo .xtc com as coordenadas atômicas ao longo do tempo; -o rmsf.xvg: Arquivo de saída onde o RMSF será salvo, em formato .xvg.

- Raio de giro

Permite avaliar mudanças na compactação da molécula ao longo da simulação, particularmente importante para macromoléculas como proteínas e complexos nucleoproteínas (Figura 36). Um valor constante sugere que o complexo mantém sua compactação estrutural, enquanto variações indicam expansão, contração ou desdobramento (ABRAHAM et al., 2024).

Figura 36 - Fórmula para cálculo de raio de giro

$$r_g = \sqrt{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (r_i - r_{cm})^2}$$

Fonte: Autoria própria * Rg: Representa o raio de giro (ou raio de girar); $\frac{1}{n}$: Este termo representa a divisão por n , onde n é o número total de átomos ou pontos que estão sendo considerados na molécula; r_i : Representa a posição do átomo i na molécula, é o vetor de posição que descreve onde o átomo está localizado no espaço; r_{cm} : Representa a posição do centro de massa da molécula, sendo o ponto que representa a média ponderada das posições de todos os átomos na molécula, levando em conta suas massas.

O cálculo do raio de giro dentro do GROMACS é possível, após a execução da MD, através do comando demonstrado na Figura 37.

Figura 37 - Comando para cálculo de raio de giro

```
gmx gyrate -s MD.tpr -f MD_center.xtc -o gyrate1.xvg -tu ns
```

Fonte: Autoria própria. * gmx gyrate: Comando para calcular o raio de giro; -s MD.tpr: Arquivo .tpr de entrada com a topologia e parâmetros da simulação; -f MD_center.xtc: Arquivo .xtc com as coordenadas atômicas ao longo do tempo; -o gyrate1.xvg: Arquivo de saída onde o raio de giro será salvo, em formato .xvg; -tu ns: Unidade de tempo para o cálculo, aqui definido como nanossegundos (ns).

- Ligações de hidrogênio

O cálculo e análise das ligações de hidrogênio são fundamentais para entender interações moleculares detalhadas, mostrando ao longo do tempo aquelas interações que são persistentes ou transitórias, fornecendo informações importantes sobre estabilidade do complexo e mudanças conformacionais, sendo crucial para compreender o mecanismo de ação de enzimas, estabilidade de estruturas secundárias e terciárias, e neste caso um dado que pode colaborar para a especificidade de ligação de fármacos. O módulo para realizar os cálculos de ligações de hidrogênio no GROMACS se chama hbond (Figura 38) que realiza análise entre doadores e aceptores possíveis através de um critério geométrico para determinar a existência das ligações (ABRAHAM et al., 2024).

Figura 38 – Cálculo das ligações de hidrogênio

```
gmx hbond -s MD.tpr -f MD_center.xtc -num hb.xvg -tu ns
```

Fonte: Autoria própria. * gmx hbond: Comando para calcular as ligações de hidrogênio; -s MD.tpr: Arquivo .tpr de entrada com a topologia e parâmetros da simulação; -f MD_center.xtc: Arquivo .xtc com as coordenadas atômicas ao longo do tempo; -num hb.xvg: Arquivo de saída onde o número de ligações de hidrogênio será salvo, em formato .xvg; -tu ns: Unidade de tempo para o cálculo, aqui definido como nanossegundos (ns).

- Pair distance

A ferramenta pairdist do GROMACS (Figura 39) permite que seja possível calcular distância entre pares de átomos ou grupos de átomos ao longo da MD, permitindo assim a análise do empacotamento das proteínas através da investigação da proximidade dos átomos e resíduos, avaliando assim áreas com potencial de instabilidade e encontrando informações sobre as interações intramoleculares que contribuem para estabilidade e função da proteína.

Figura 39 - Cálculo de distância entre pares de átomos ou grupos de átomos

```
gmx pairdist -s MD.tpr -f MD_center.xtc -o pairdist1.xvg -tu ns
```

Fonte: Autoria própria. *- gmx pairdist: Comando para calcular pairdist; -s MD.tpr: Arquivo .tpr de entrada com a topologia e parâmetros da simulação; -f MD_center.xtc: Arquivo .xtc com as coordenadas atômicas ao longo do tempo. -o pairdist1.xvg: Arquivo de saída onde o cálculo de pairdist será salvo, em formato .xvg; -tu ns: Unidade de tempo para o cálculo, aqui definido como nanossegundos (ns).

4.14. gmx_MMPBSA

O gmx_MMPBSA (VALDÉS-TRESANCO et al., 2021) é uma ferramenta desenvolvida baseada no pacote do AMBER MMPBSA.py com objetivo de realizar cálculos de energia livre no estado final com arquivos GROMACS. Essa ferramenta permite superar limitações anteriores para os determinados cálculos, como incompatibilidade com diferentes versões do GROMACS e suporte limitado a sistemas específicos. Entretanto, o gmx_MMPBSA se destaca pela capacidade em lidar com sistemas proteína-proteína e proteína-ligante, abrangendo uma ampla gama de aplicações em biologia molecular, além disso, o principal motivo da escolha dessa ferramenta é a possibilidade de trabalhar com diversos campos de força, permitindo aos usuários que escolham o campo mais adequado ao sistema de estudo.

Outros pontos de destaque da ferramenta incluem sua capacidade de integração com linguagens de programação como o Python e R, permitindo que os dados gerados pela ferramenta sejam explorados de diversas formas, especialmente quando combinadas com outras bibliotecas em Python como NumPy, SciPy e Matplotlib, enquanto o R oferece ferramentas para análise estatística e modelagem de dados, e caso seja de interesse do usuário existe a possibilidade desenvolver novos

métodos de cálculo e análise, expandindo ainda mais as funcionalidades do gmx_MMPBSA (VALDÉS-TRESANCO et al., 2021).

4.14.1. Entropia

A ferramenta possui uma metodologia para calcular entropia de interação (IE) para estimar a entropia termodinâmica no cálculo de ΔG (Figura 40), baseando na teoria que a perda de liberdade de movimento das moléculas devido à interação contribui para a entropia total do sistema.

Figura 40 – Equação da Energia Livre de Gibbs

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

Fonte: Autoria própria. *onde Δ se refere à variação; G é a Energia Livre de Gibbs; H é a Entalpia; T é a Temperatura (Kelvin); e S é a entropia.

4.14.2. Energia livre de Gibbs

A variação da energia livre de Gibbs simbolizada ΔG é um conceito fundamental na termodinâmica, representando a energia útil que um sistema pode liberar para realizar trabalho sob condições de temperatura e pressão constantes, em outras palavras indica a probabilidade espontânea de um processo ocorrer. calculada como a diferença entre as energias livres de solvatação das moléculas ligadas e não ligadas.

4.14.3. Decomposição

A análise de decomposição no gmx_MMPBSA é uma funcionalidade que permite o desmembramento da energia livre de ligação entre proteínas e ligantes com contribuições em termos energéticos individuais para cada resíduo da proteína, oferecendo uma visão detalhada das interações que determinam a afinidade entre as moléculas. Por meio disso é possível identificar aminoácidos específicos que contribuem favoravelmente ou desfavoravelmente para a ligação, informando também

os tipos de interação que dominam a ligação entre a proteína e o ligante, como energias eletrostática, polaridade e Van der Waals.

4.15. Automação de cálculos

A automação para realização dos cálculos foi um ponto crucial para todo projeto, devido ao alto número de cálculos a serem realizados. Caso fossem feitos manualmente, além da demanda de tempo, existe também o risco de erro pelo fator humano, e tarefas repetitivas são facilmente automatizadas por programação. A linguagem de programação escolhida para essa tarefa foi o Python devido a sua vasta gama de bibliotecas e ferramentas disponíveis para executar o proposto, e é conhecida por sua simplicidade e flexibilidade.

4.16. Tratamento de dados

Os dados realizados pelo GROMACS foram armazenados em formato .xvg, e embora seja um formato adequado sua manipulação e análise podem ser desafiadoras devido à sua estrutura e limitações para integração com ferramentas de análise de dados mais modernas, portanto convertemos esses dados para Microsoft® Excel. Outro fator de motivação para conversão desses dados é que devido ao fato de serem utilizadas ferramentas distintas para obtenção desses dados, ambas ilustravam de formas distintas, não seguindo um padrão entre si e dificultando a análise.

Para superar essas dificuldades, foi desenvolvido um script em Python utilizando a biblioteca pandas (PANDAS DEVELOPMENT TEAM, 2024), que permitiu a conversão desses dados para o formato .xlsx que é aceito por programas como Excel, LibreOffice ou Google Sheets. Além disso o script foi construído de forma aonde os dados não foram apenas convertidos para outro formato de arquivo, mas também agrupados em resultados para as seis dinâmicas moleculares distintas em um único arquivo Excel. Cada dinâmica foi separada por uma planilha dentro do mesmo arquivo. Outro ponto de foco do script foi a conversão dos valores de nanômetros gerados pelo GROMACS para angstroms, e por fim também foi inserida uma função para obtenção de uma sétima planilha que compilou todos os valores das dinâmicas, para permitir uma visão abrangente dos dados.

Quanto à organização de todos esses dados, os arquivos .xvg e cada tipo de cálculo realizado, como energia do sistema, RMSD, RMSF, raio de giro, ligações de hidrogênio e pairdistance, foram mantidos separados em pastas correspondentes, garantindo que os dados relacionados estejam agrupados de maneira lógica e acessível. Dentro dessas pastas principais, foram criadas subpastas para cada aminoácido analisado, permitindo uma estrutura hierárquica que reflete a organização dos dados experimentais e facilita a navegação e a localização de informações específicas.

4.17. Obtenção dos gráficos

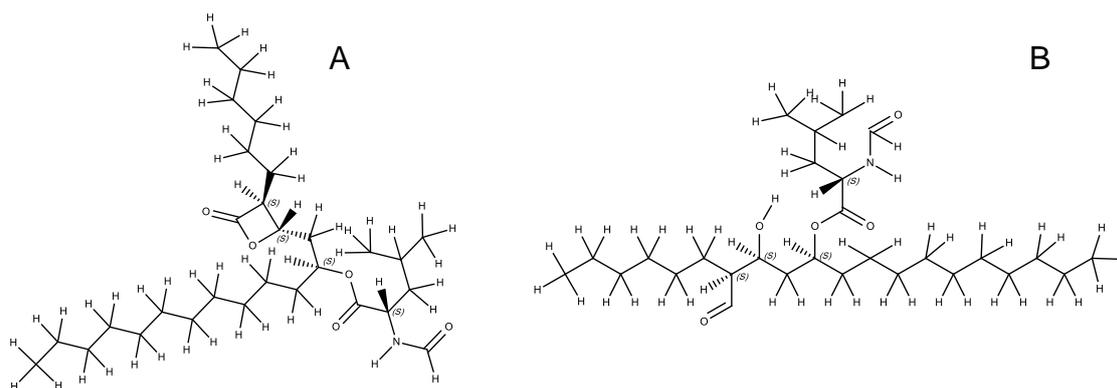
Após a conversão e organização dos dados para o formato .xlsx foi necessário visualizar os dados para obter as informações de interesse e interpretar os resultados. Novamente utilizando Python e a biblioteca pandas para leitura do arquivo .xlsx para facilitar a manipulação e análise estatística dos dados, e com eles tabulados e acessíveis existem diversas técnicas analíticas e métodos que podem ser empregados, foi utilizada a biblioteca matplotlib (HUNTER, 2007), que permite a criação de gráficos de linha, barra, dispersão, histograma, entre outros com alto grau de personalização. O script foi criado para gerar gráficos referente a cada planilha dentro do arquivo .xlsx, e dois outros gráficos adicionais, um responsável por concatenar todos os valores referentes às dinâmicas envolvendo o modelo de enzima 3HRH, e outro para os modelos de 5VNS, obtendo gráficos distintos separados por pastas. Trabalhamos com dois scripts diferentes, um para gerar gráficos de linha para os cálculos de RMSD, RMSF, raio de giro, e pairdistance, e outro para gerar gráficos de coluna para os cálculos de ligações de hidrogênio e energia.

5. Resultados e Discussão

5.1. Modelagem dos ligantes

Os ligantes Orlistat e Orlistat hidrolisado foram modelados e caracterizados computacionalmente, obtendo as estruturas apresentadas na Figura 41. As características físico-químicas estão apresentadas na Tabela 1.

Figura 41 – Ligantes utilizados nos estudos



Fonte: Autoria Própria. As imagens foram convertidas em planares (2D) para fins de melhor visualização no presente trabalho. A: Orlistat (Tetrahidrolipstatina); B: Orlistat hidrolisado

Tabela 1 – Características Físico-Químicas dos ligantes utilizados

Parâmetro	Orlistat	Orlistat hidrolisado
logP	8,11	6,84
Momento de dipolo	5,26 Debye	3,22 Debye
Área de Superfície Polar (2D)	81,7Å ²	92,7Å ²
Área da Superfície Molecular (3D - VdW)	926,48Å ²	916,32Å ²
Volume de Van der Waals	525,84Å ³	522,04Å ³
Ligação de H (Acc/Don)	1/3	4/2

*VdW = Van der Waals; Acc/Don = Aceptor / Doador de ligação de hidrogênio

Os parâmetros físico-químicos calculados mostram que existem diferenças maiores na lipossolubilidade, no momento de dipolo e no potencial de realização de ligações de hidrogênio, o que pode ajudar a explicar as respostas obtidas nas dinâmicas moleculares subsequentes.

5.2. Docagem Molecular

A docagem foi realizada para os complexos de Ag85c e THL (ORL) ou Ag85c e THL “hidrolisado” (ORLm). Para o modelo 5VNS da Ag85c o docking ainda foi realizado com e sem moléculas de água mantidas no sítio catalítico. Os melhores “scores” CHEMPLP.Fitness para cada associação estão descritos na Tabela 2.

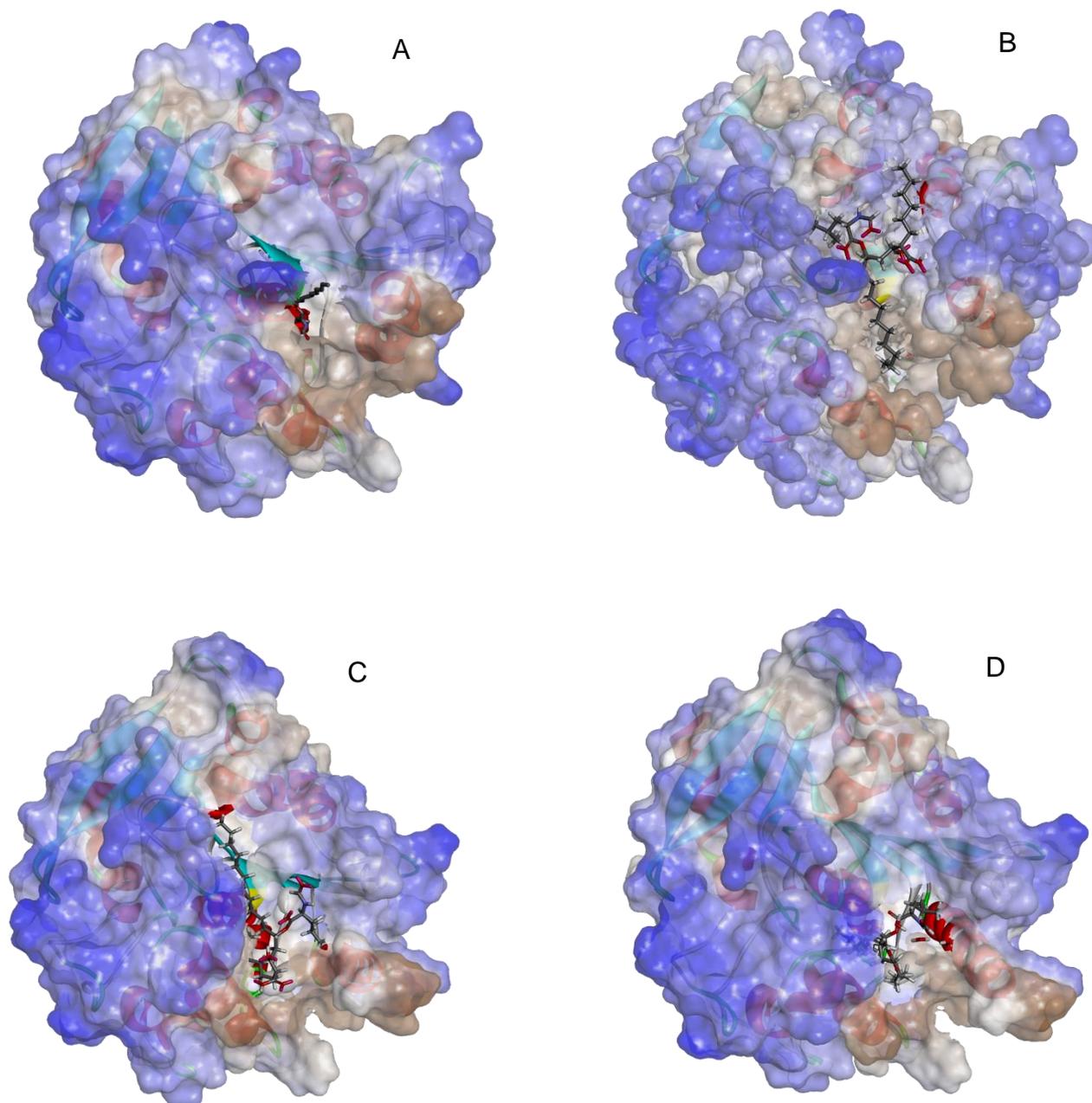
Tabela 2 – Resultados do “score” CHEMPLP.Fitness das melhores poses obtidas no docking

Associação	Score CHEMPLP.Fitness
3HRH + ORL	87.7532
3HRH + ORLm	91.2432
5VNS + ORLm	88.8645
5VNS _{H2O} + ORLm	88.5984

*3HRH e 5VNS: Código PDB da proteína Ag85c de *M. tuberculosis*. ORL: orlistat (Tetrahidrolpstatina); ORLm: orlistat hidrolisado .

É possível observar pelos resultados dos “scores” obtidos na docagem que a afinidade é bastante semelhante, independente da enzima e do ligante utilizados. Entretanto, quando se observam as melhores poses (Figura 42), é nítido que o Orlistat íntegro (não hidrolisado – Figura 42A) consegue entrar melhor no “pocket” da enzima 3HRH, do que o Orlistat hidrolisado (Figura 42B) que é o nosso modelo de enzima ativa. Isso corrobora o entendimento de que para a inibição enzimática acontecer o THL (Orlistat) entra na enzima Ag85c e é hidrolisado pela atividade catalítica da mesma.

Figura 42 – Docagem molecular entre Ag85c e THL (Orlistat)

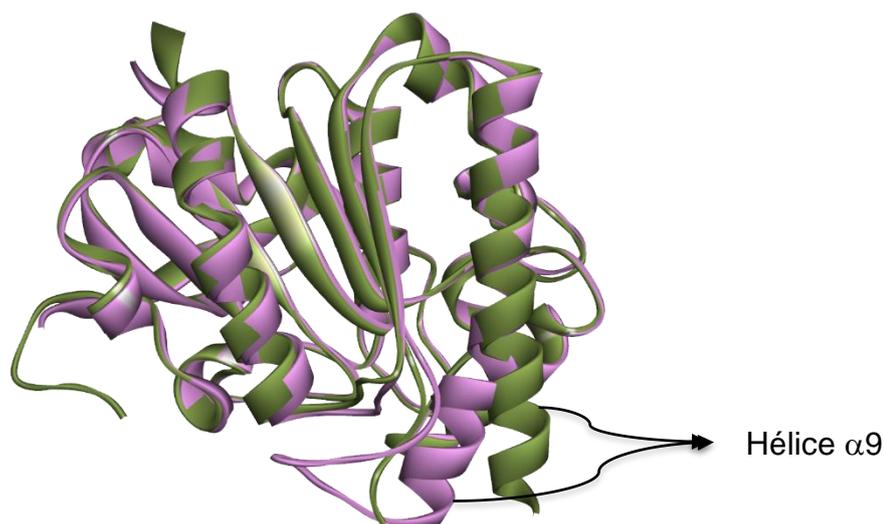


Fonte: Autoria Própria. A: ORL docado na enzima Ag85c (PDB 3HRH); B: ORL hidrolisado docado na enzima Ag85c (PDB 3HRH); C: ORL hidrolisado docado na enzima Ag85c (PDB 5VNS); D: ORL hidrolisado docado na enzima Ag85c (PDB 5VNS), com moléculas de água no sítio catalítico.

Ainda, uma vez que existe a ligação do Orlistat hidrolisado ao sítio catalítico, deve acontecer algum tipo de alteração no espaço disponível dentro do “pocket” da enzima. É provável que essa alteração seja a movimentação da hélice $\alpha 9$, que se mostra em posição diferente na proteína 5VNS (Figura 43). As hélices apresentam um RMSD de 3,315Å entre as duas estruturas. Se considerarmos apenas os resíduos que mais se movimentam (ILE222 a LEU230), esse RMSD sobe para 5,275Å. Considerando que um dos resíduos da tríade catalítica é justamente o GLU228 (cuja função será discutida a seguir), esse deslocamento da hélice, induzida pelo Orlistat hidrolisado pode ser o responsável pela irreversibilidade da ligação.

Além disso, a presença de água no sítio catalítico (Figura 42D) aparenta ser importante para a melhor pose do Orlistat metabolizado, já que com essa configuração o ligante se apresentou mais inserido no “pocket” da enzima em relação ao mesmo ligante docado na proteína 5VNS com todas as águas removidas do sistema.

Figura 43 - Sobreposição das enzimas Ag85C PDB 3HRH e 5VNS



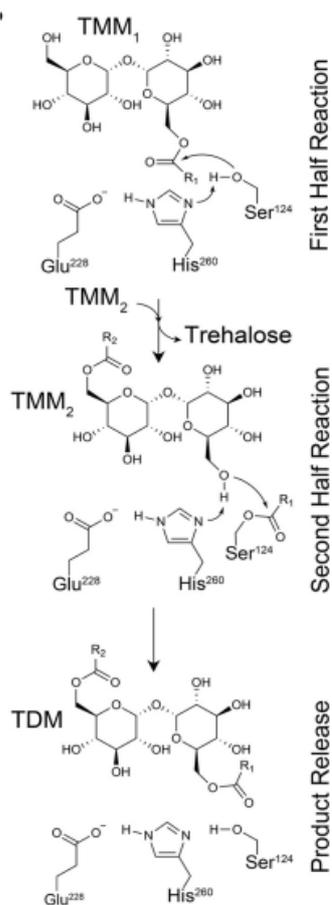
Fonte: Autoria Própria. PDB 3HRH em cor rosa. PDB 5VNS em cor verde. Hélice $\alpha 9$ indicada na imagem.

5.3. Complexo Ag85c-THL

5.3.1. Mecanismo de ação da Ag85c

A Ag85c é uma enzima multifuncional que atua como uma micoliltransferase, com função de catalisar a transferência de ácidos micólicos para a parede celular, que de forma simplificada e didática realiza fisiologicamente, na micobactéria, três reações, catalisando a transferência de um tipo de lipídio chamado ácido micólico (MA) de um doador (trealose monomicolato - TMM) para um aceitador (arabinogalactano - AG) ou outro TMM, formando trealose dimicolato (TDM) ou micolil arabinogalactano (mAG). Inicialmente temos a interação do sítio ativo da enzima com um doador de ácido micólico, geralmente a trealose monomicolato, onde os resíduos de aminoácidos Ser124, His260 e Glu228 desempenham as principais reações (Figura 44).

Figura 44 – Mecanismo de reação fisiológico da Ag85c



Fonte: GOINS et al., 2018a

Após o posicionamento do TMM no sítio ativo, a hidroxila do resíduo de Ser124 atua como um nucleófilo atacando o carbono eletrofílico do TMM, resultando na formação de um intermediário acil-enzima, onde a Ser124 está covalentemente ligada

ao TMM. Esse processo é desencadeado pela His260, que atua como um estabilizador e um ativador da reação tendo um papel semelhante a uma base, facilitando a desprotonação do grupo hidroxila da Ser124, o que aumenta a reatividade do oxigênio nucleofílico. Além disso, o resíduo His260 pode formar uma ligação de hidrogênio com o grupo carbonílico do TMM, ajudando a estabilizar a transição do estado de reação. Por outro lado, o Glu228 atua como um ácido, doando um próton e regulando o pH local no sítio ativo, importante para a ativação do nucleófilo e a formação do intermediário, garantindo que a reação prossiga de maneira eficiente.

Com a formação do intermediário acil-enzima, a reação avança para a segunda metade, onde um segundo TMM se liga ao sítio ativo da Ag85c, onde a interação entre His260 e o segundo TMM é fundamental para a formação da nova ligação, enquanto Glu228 continua a desempenhar seu papel ajudando a estabilizar o estado de transição, e finalmente, após a formação do TDM, o produto é liberado do sítio ativo da Ag85c.

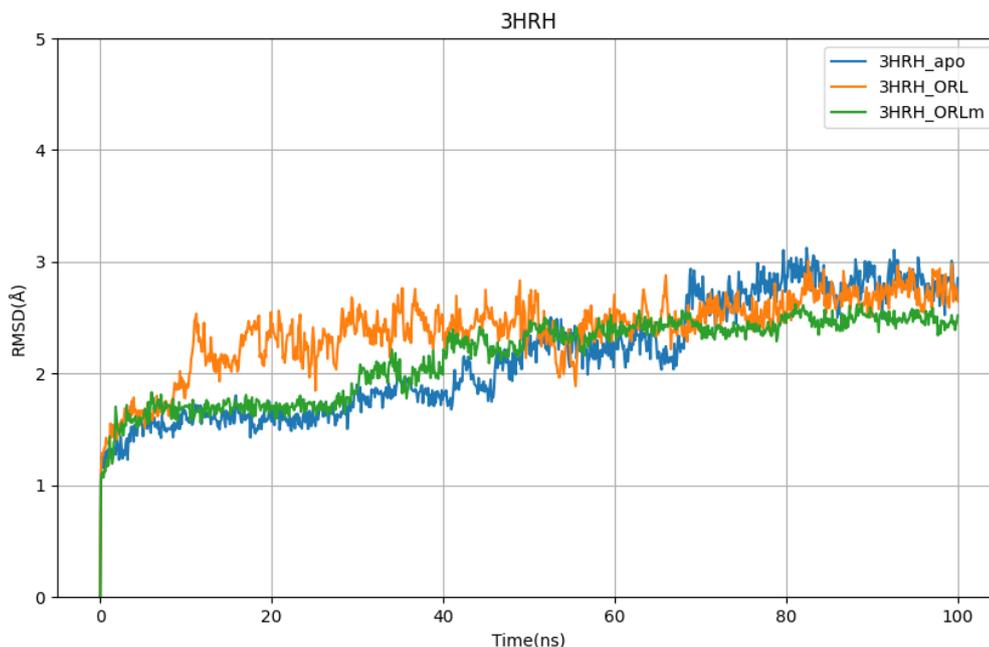
A dinâmica entre Ser124, His260 e Glu228 é essencial para garantir que a reação ocorra de forma eficiente e que o produto final seja formado e liberado adequadamente. Por meio dessa interação coordenada entre esses resíduos de aminoácidos não apenas permite a síntese do TDM, mas também exemplifica a complexidade e a precisão das reações enzimáticas em sistemas biológicos.

5.3.2. Dinâmicas Moleculares

5.3.2.1. RMSD Enzima-Enzima

Para a 3HRH quando observado a enzima apo o RMSD teve sua maior variação com quase 2 angstroms de diferença se comparado ao ponto inicial e final da dinâmica, a 3HRH com THL hidrolisado teve valores muito próximos se comparado a enzima apo. Entretanto quando temos o THL inteiro o RMSD foi mais estável, variando menos que 1 angstrom ao longo de toda a dinâmica, e com as alterações mais significativas no começo, dessa forma interpretamos que nesta conformação com o THL íntegro a enzima sofre alterações maiores e com uma velocidade superior se comparada aos outros, mas depois de um tempo há uma estabilização (Figura 45).

Figura 45 - RMSD das dinâmicas 3HRH comparando enzima-enzima ao longo do tempo

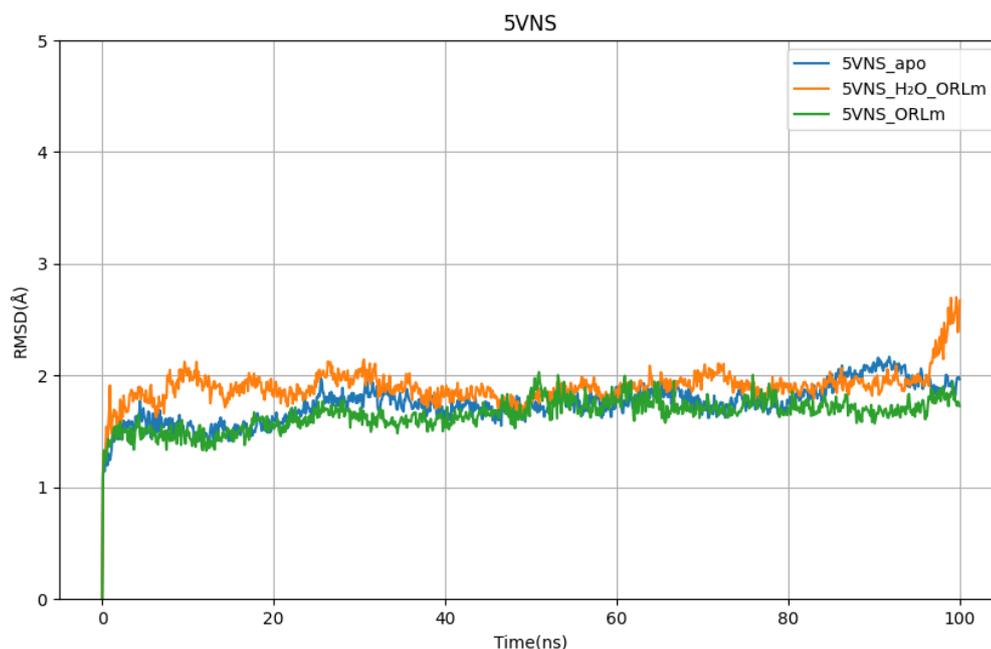


Fonte: Autoria própria.

Ao observar a enzima 5VNS os valores também são muito próximos, mostrando que essa conformação tem uma estabilidade maior quando comparada ao 3HRH quando o THL está em sua conformação com o anel β -propiolactâmico aberto (Figura 46).

Observando ambos os gráficos em conjunto temos resultados que são semelhantes aos encontrados na literatura, mostrando que a hélice $\alpha 9$ possui um papel fundamental no impacto da inibição da enzima e nas interações moleculares com determinadas moléculas (GOINS et al., 2017).

Figura 46 - RMSD das dinâmicas 5VNS comparando enzima-enzima ao longo do tempo

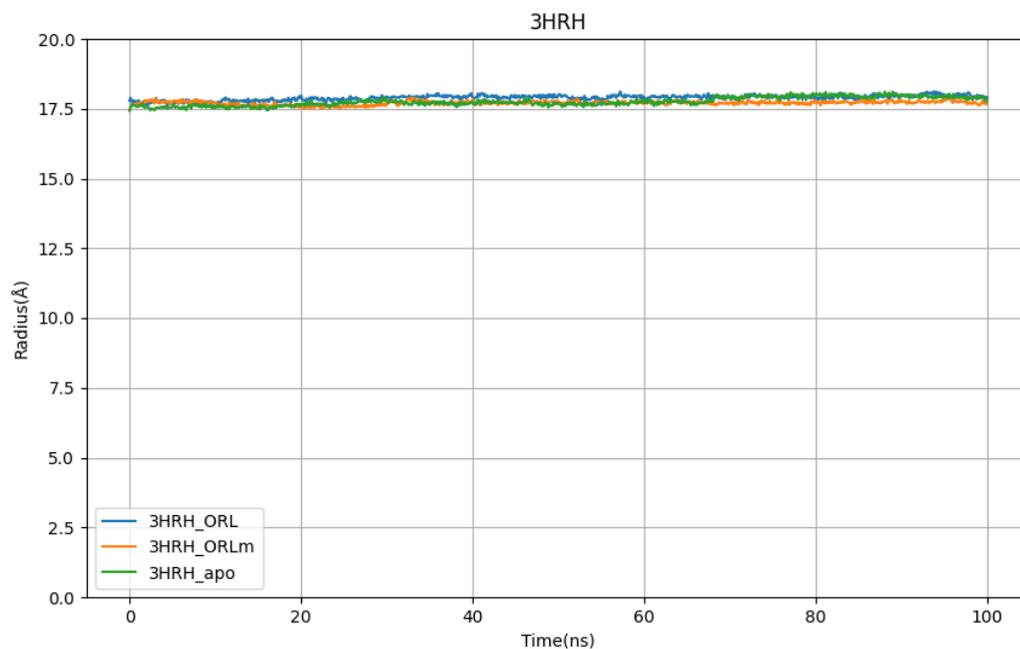


Fonte: Autoria própria.

5.3.2.2. Raio de giro

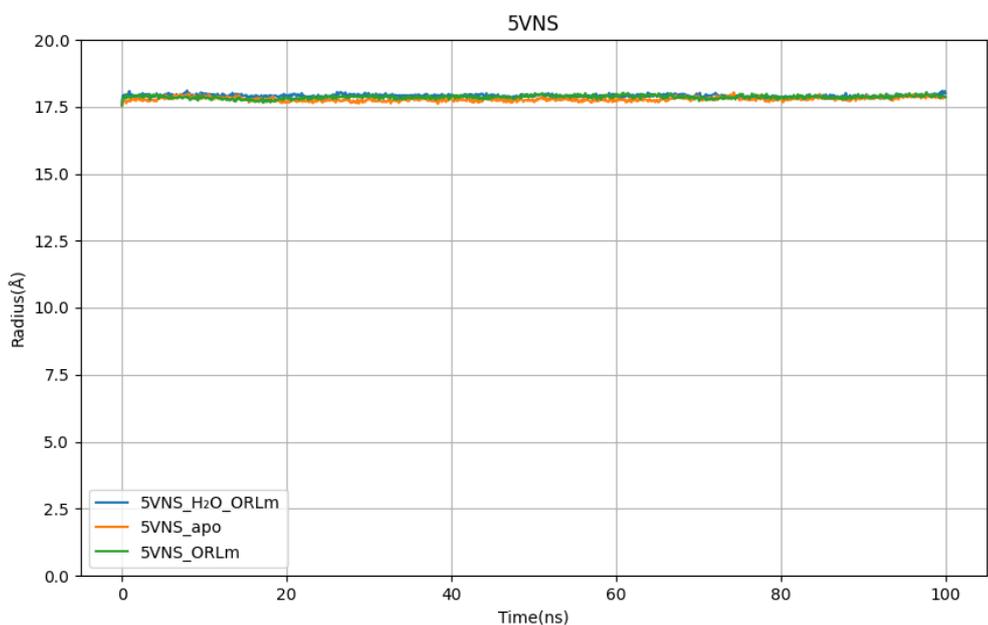
O raio de giro de todas as dinâmicas, independente da enzima utilizada, foi muito próximo (Figuras 47 e 48), mas é muito interessante de se observar os valores, onde o raio de giro teve uma variação próxima aos 17 angstroms ao longo do tempo. Consultando a literatura encontramos um estudo onde foram utilizados outros 3 ligantes para a Ag85c, e no mesmo os valores ficaram entre 20 à 22 angstroms, indicando que no nosso estudo com THL a enzima assumiu uma conformação mais compacta ao longo dos 100ns. (NAGPAL et al., 2020).

Figura 47 - Raio de giro durante a dinâmica entre a Ag85c (PDB 3HRH) e o Orlistat ou Orlistat hidrolisado



Fonte: Autoria própria. A enzima “apo” (sem ligante, em verde), serve como comparação

Figura 48 - Raio de giro durante a dinâmica entre a Ag85c (PDB 5VNS) e o Orlistat hidrolisado com ou sem água no sítio catalítico



Fonte: Autoria própria. A enzima “apo” (sem ligante, em verde), serve como comparação

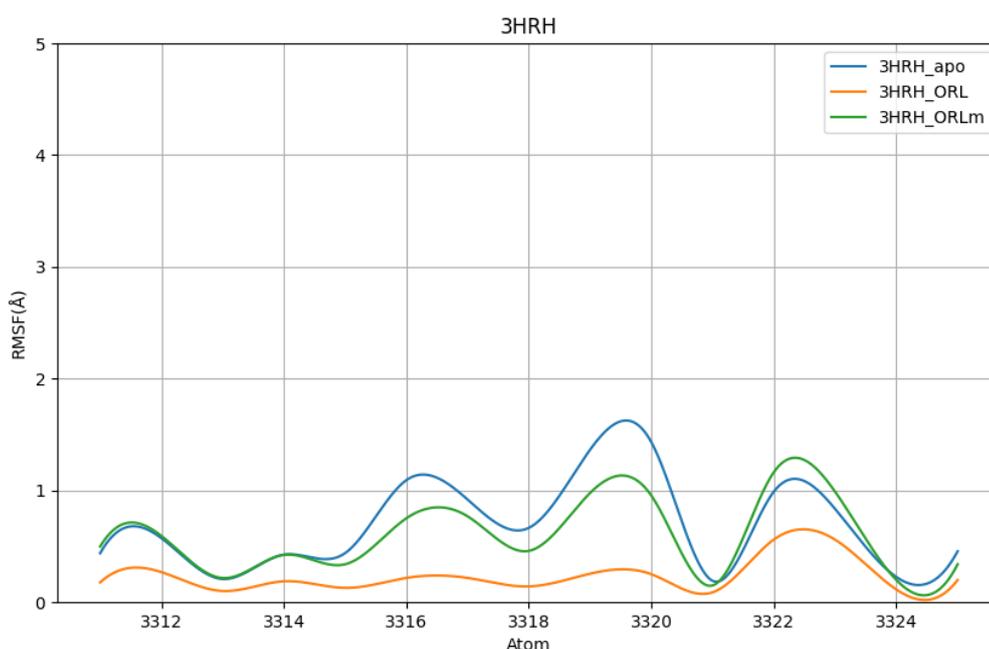
5.3.2.3. Cálculos por resíduo

Após as dinâmicas, os resultados dos cálculos energéticos e cinéticos foram plotados e avaliados. As variações significativas dos resíduos importantes para a catálise mediada pela Ag85c estão descritas nos tópicos a seguir

5.3.3. RMSF – Glu228

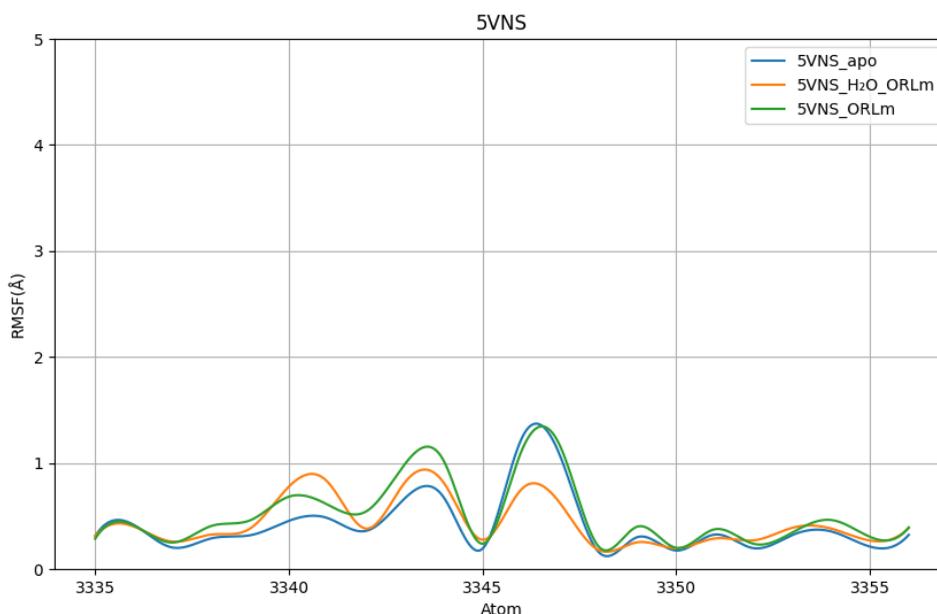
Para as dinâmicas com 3HRH quando o anel propriolactâmico está inteiro (Figura 49) o aminoácido teve uma variação menor de movimentação em toda a dinâmica, de todos os seus átomos, o que pode demonstrar que a interação que leva à hidrólise do Orlistat passa pela imobilização deste resíduo. Tanto é assim que o Orlistat já hidrolisado interfere muito pouco na mobilidade deste resíduo (Figura 49 e 50). O Glu228 faz parte da tríade catalítica da enzima junto com Ser124 e His260 (RUNNING et al., 2000), reforçando que a estrutura do anel é fundamental para atividade do THL (GOINS et al., 2018b).

Figura 49 - RMSF do resíduo Glu228 da Ag85c (PDB 3HRH) e o Orlistat ou Orlistat hidrolisado



Fonte: Autoria própria. A enzima “apo” (sem ligante, em azul), serve como comparação

Figura 50 - RMSF do resíduo Glu228 da Ag85c (PDB 5VNS) e o Orlistat hidrolisado com ou sem água no sítio catalítico

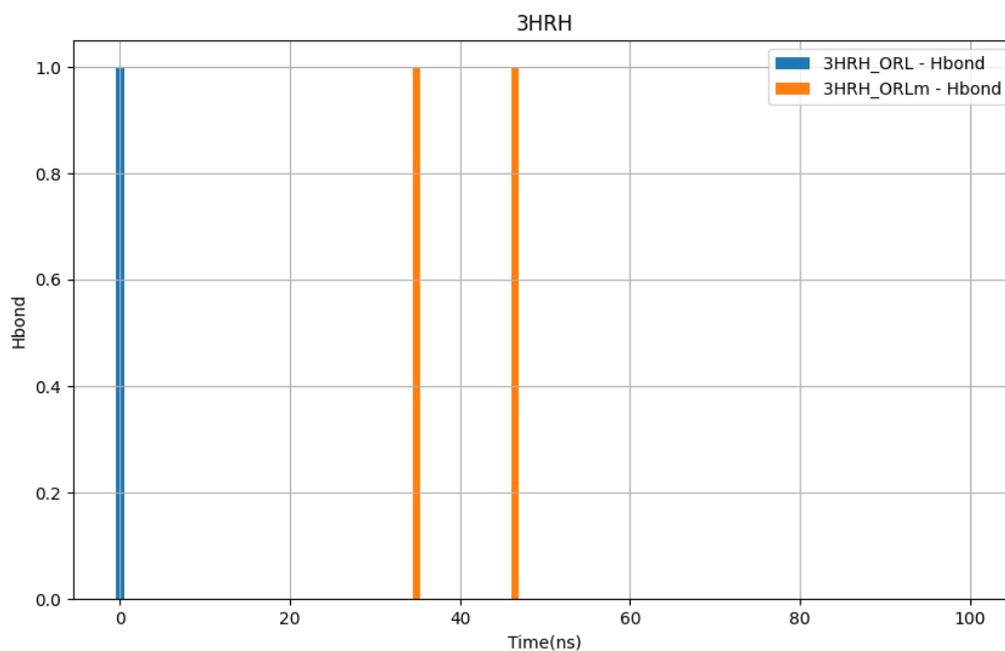


Fonte: Autoria própria. A enzima “apo” (sem ligante, em azul), serve como comparação

5.3.4. Ligação de hidrogênio – Ser124

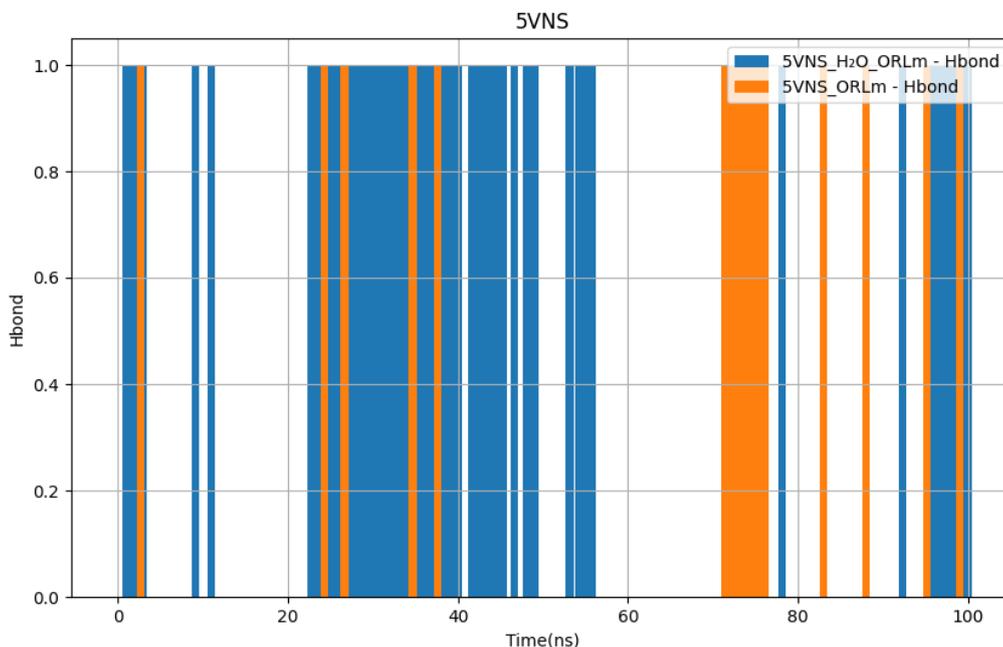
Para a enzima 3HRH tivemos poucas ligações de hidrogênios, esporádicas, durante a dinâmica (Figura 51), mas ao observar a enzima 5VNS quando há a presença de água no sítio catalítico temos ligações de hidrogênio muito frequentes durante toda a dinâmica, indicando a possibilidade de interações durante esse momento (Figura 52). A ser124 é um importante alvo para inibição da Ag85c, sendo o principal aminoácido que realiza a reação da enzima (GOINS et al., 2018a), sendo um alvo bastante promissor e estudado por diversos autores devido ao seu papel crítico (ADEWUMI et al., 2022).

Figura 51 – Ligações de hidrogênio para o resíduo Ser124 durante a dinâmica entre a Ag85c (PDB 3HRH) e o Orlistat ou Orlistat hidrolisado



Fonte: Autoria própria. Note que, neste caso não temos a enzima apo, uma vez que por não ter ligante não há um segundo grupo para comparar e calcular as ligações de hidrogênio, e o mesmo se repete para gráficos posteriores.

Figura 52 – Ligações de hidrogênio para o resíduo Ser124 durante a dinâmica entre a Ag85c (PDB 5VNS) e o Orlistat hidrolisado com ou sem água no sítio catalítico

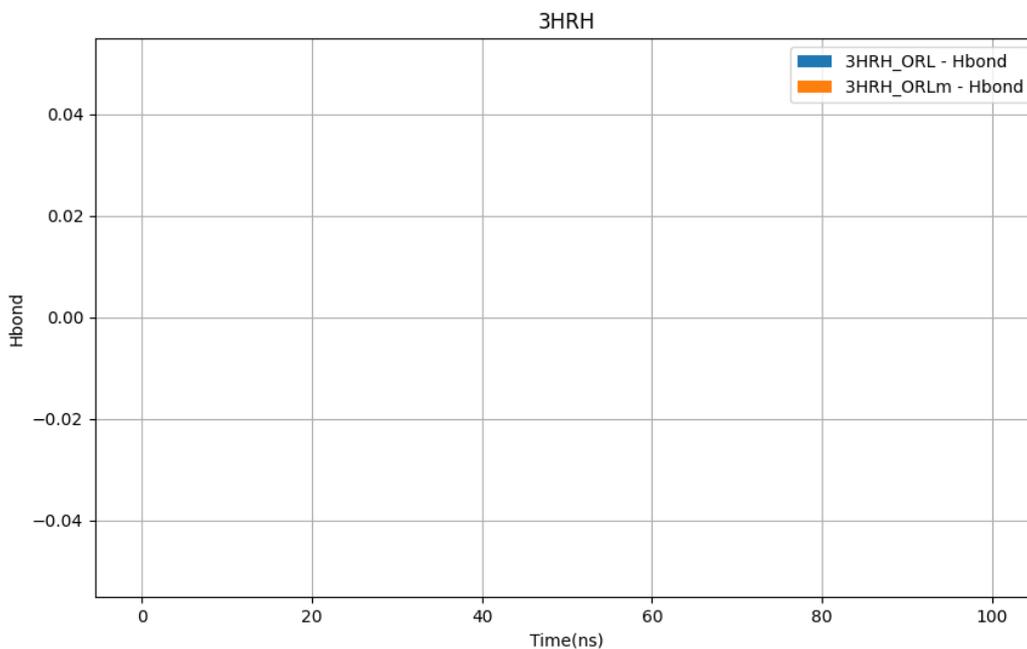


Fonte: Autoria própria.

5.3.5. Ligação de hidrogênio - Glu228

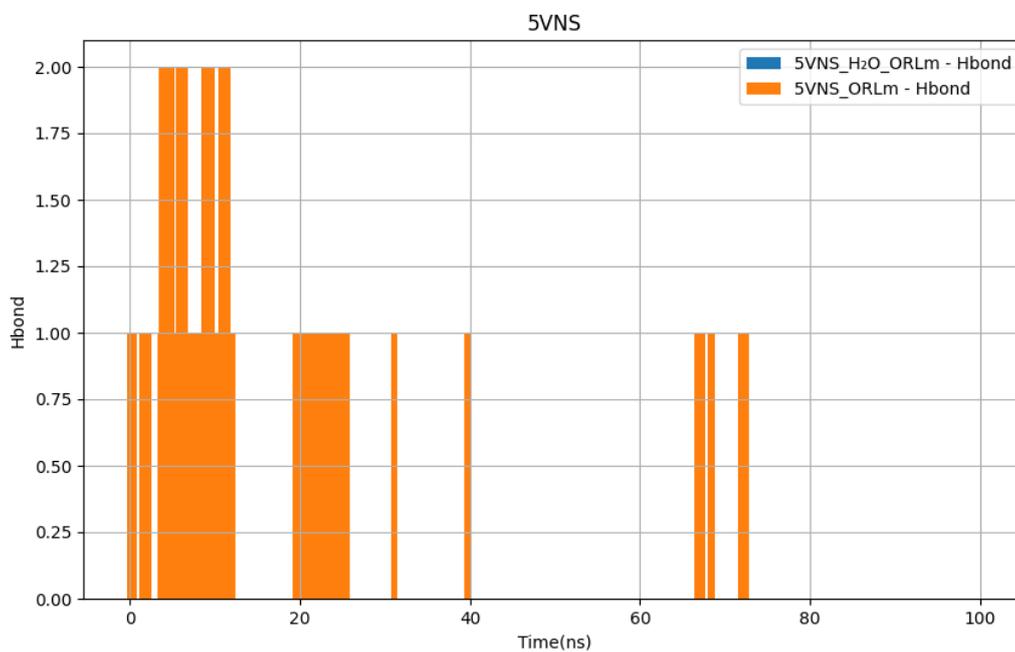
Ao analisar todas as dinâmicas vemos que para 3HRH não há quaisquer indícios de ligações de hidrogênio ao longo da dinâmica (Figura 53), apenas quando temos a enzima 5VNS, especificamente com ausência de água no sítio catalítico é que acontece ligações de hidrogênio em diversos momentos ao longo do tempo (Figura 54). Esse dado ilustra novamente como a hélice alfa-9 e a conformação da enzima é importante para determinadas interações (GOINS et al., 2017).

Figura 53 – Ligação de hidrogênio para o resíduo Glu228 durante a dinâmica entre a Ag85c (PDB 3HRH) e o Orlistat ou Orlistat hidrolisado



Fonte: Autoria própria.

Figura 54 - Ligações de hidrogênio para o resíduo Glu228 durante a dinâmica entre a Ag85c (PDB 5VNS) e o Orlistat hidrolisado com ou sem água no sítio catalítico



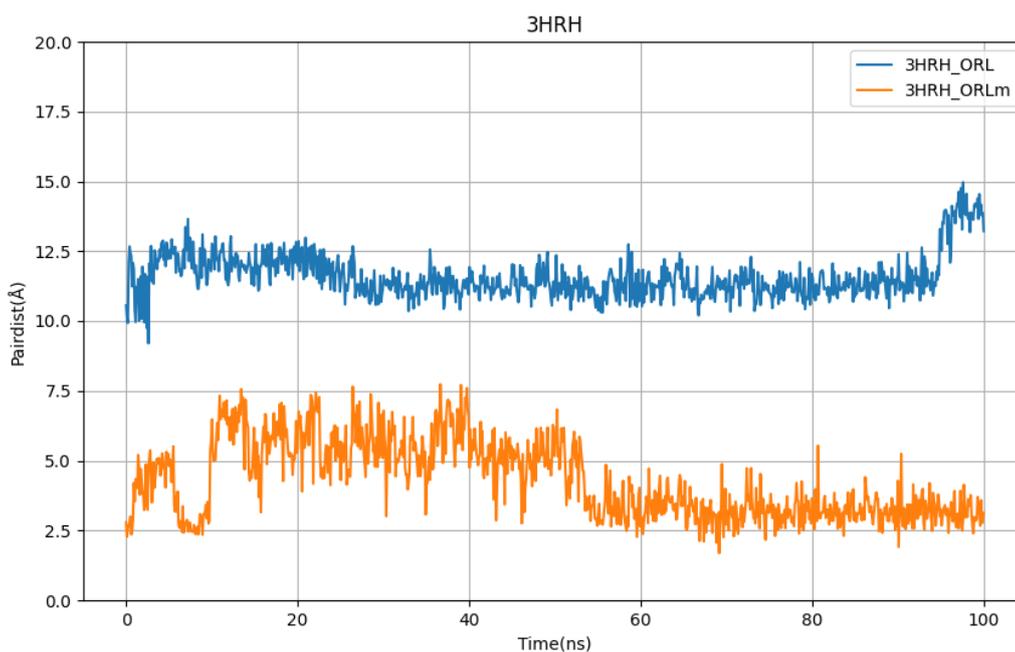
Fonte: Autoria própria.

5.4. Pairedistance aminoácidos

5.4.1. Pairedistance - Ser124

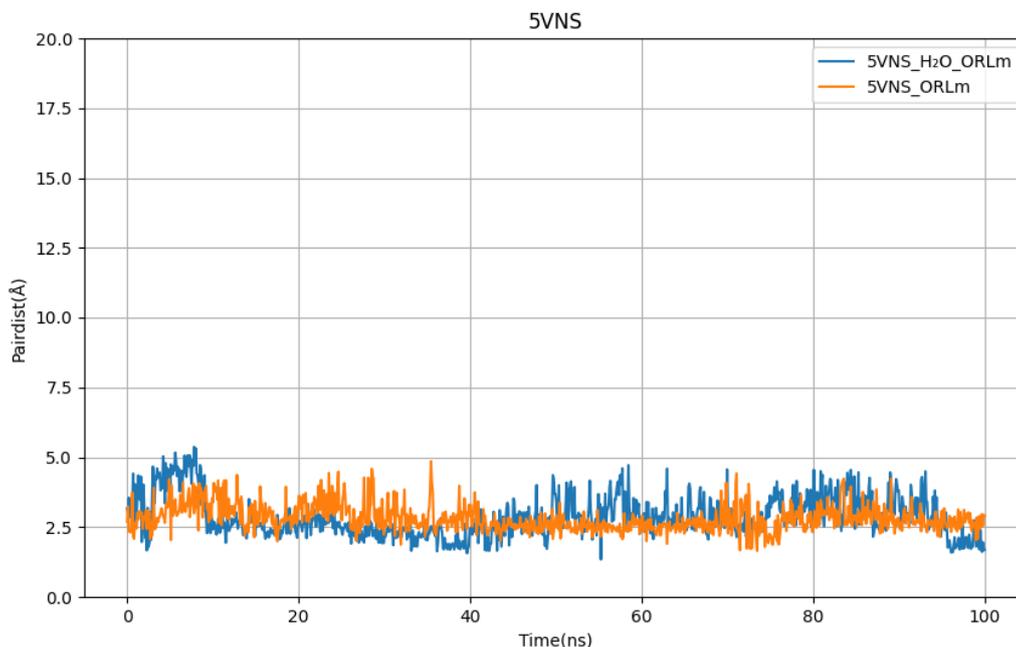
Em 3HRH com o THL inteiro houve uma repulsão significativamente alta entre esse aminoácido e o THL durante toda a dinâmica se comparado ao THL na forma hidrolisada, com média de 8 angstroms de diferença durante toda a dinâmica (Figura 55), sendo um possível indício que para esta interação acontecer o anel propriolactâmico deve estar na sua forma íntegra. Mas para 5VNS (Figura 56) não houve maiores alterações. A inibição da Ser124 pode afetar a atividade de transferência de mocolil, inibindo a síntese de trealose dimicolato e a micolilação de arabinogalactano (VILJOEN et al., 2018).

Figura 55 - Pairedistance para o resíduo Ser124 da Ag85c (PDB 3HRH) e o Orlistat ou Orlistat hidrolisado



Fonte: Autoria própria.

Figura 56 – Pairedistance para o resíduo Ser124 da Ag85c (PDB 5VNS) e o Orlistat hidrolisado com ou sem água no sítio catalítico



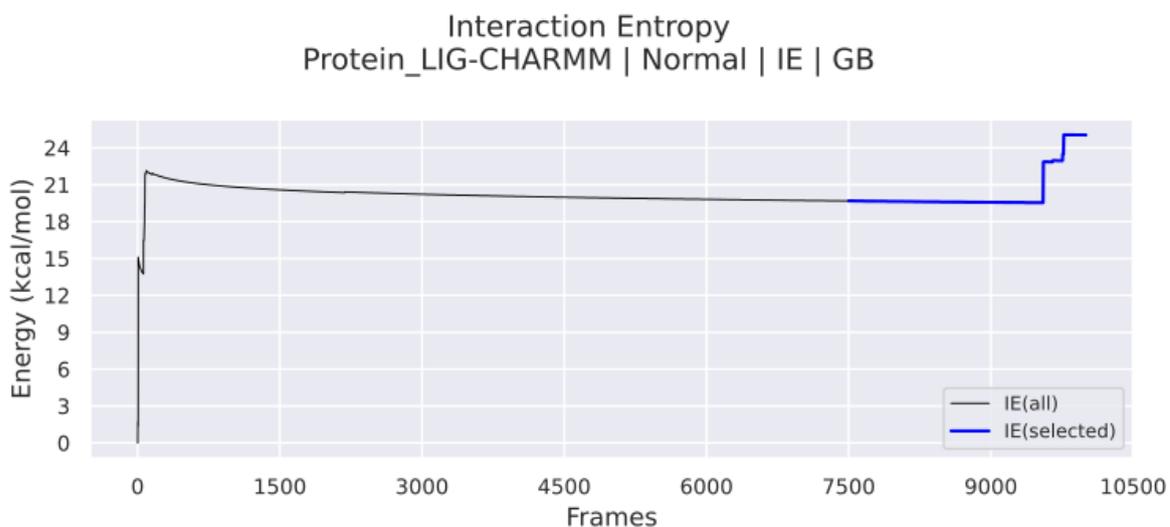
Fonte: Autoria própria.

5.5. Cálculos de MMPBSA

5.5.1. Entropia

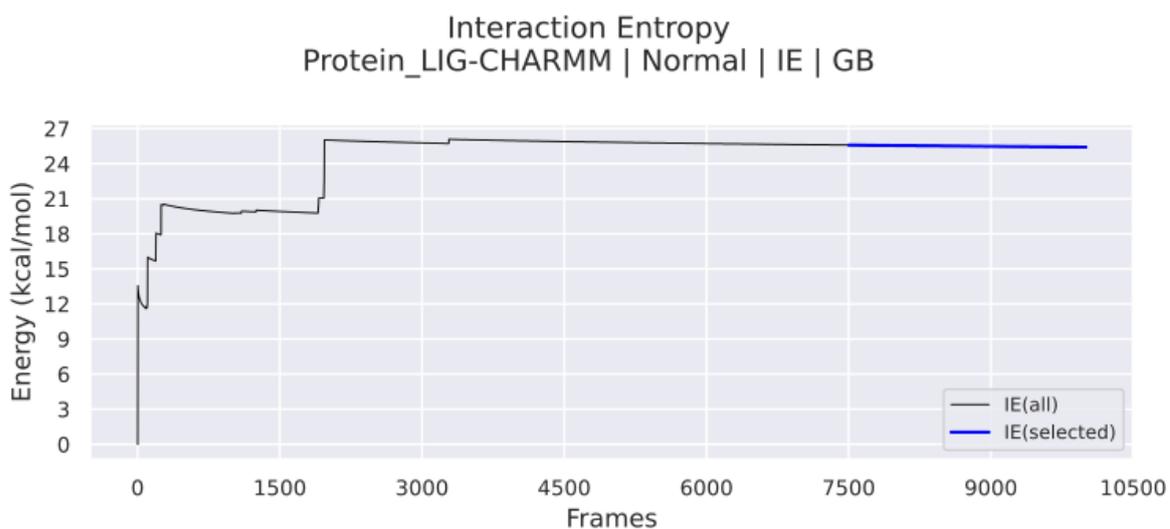
Para as dinâmicas com a enzima na forma de 3HRH os resultados foram relativamente próximos, enquanto com o THL em sua forma inteira a energia alcançou o ponto de 24 Kcal/mol (Figura 57), com ele hidrolisado o valor alcançado foi de 27 Kcal/mol (Figura 58). Também é interessante ser ressaltado a forma como aconteceu a progressão energética, enquanto com o THL em sua forma inteira a variação foi mais abrupta após os 90ns se mantendo estável no valor de aproximadamente 21 Kcal/mol ao longo da dinâmica, com o THL hidrolisado a variação aconteceu logo nos primeiros 20ns. Com base nisso podemos inferir que, enquanto com o THL inteiro a enzima pode ter tido uma repulsão ao THL apenas nos momentos finais, para o THL hidrolisada com a enzima nessa conformação a repulsão aconteceu logo nos primeiros nanossegundos.

Figura 57 – Entropia de interação da dinâmica 3HRH com THL inteiro ao longo do tempo



Fonte: Autoria própria.

Figura 58 – Entropia de interação da dinâmica 3HRH com THL hidrolisado ao longo do tempo

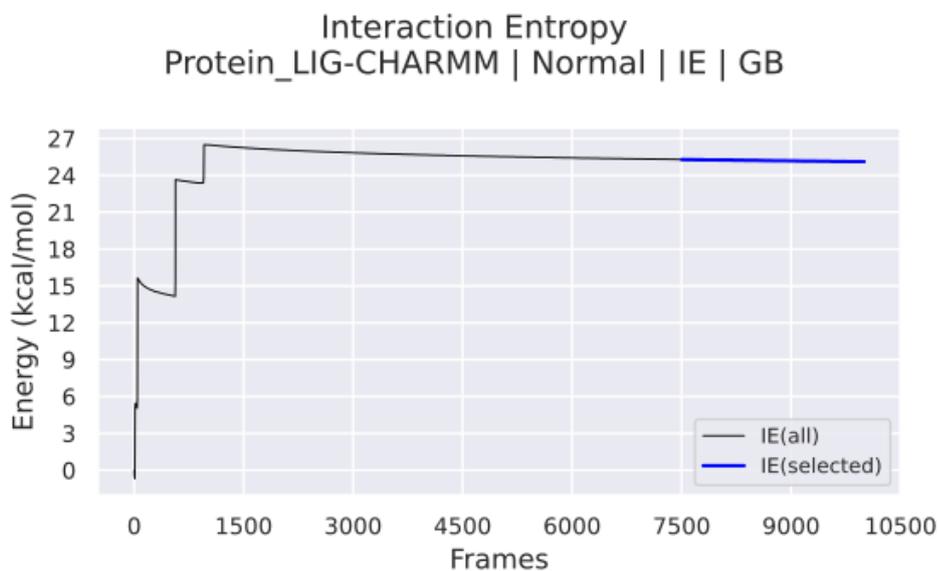


Fonte: Autoria própria.

Ao observar o THL com a enzima 5VNS na presença de água a entropia se estabilizou por volta de 27 Kcal/mol (Figura 59), enquanto sem água em 20 Kcal/mol (Figura 60), mostrando que a presença de água alterou a perturbação do meio. Ao comparar com a 5VNS notamos que há um padrão semelhante a forma hidrolisada do

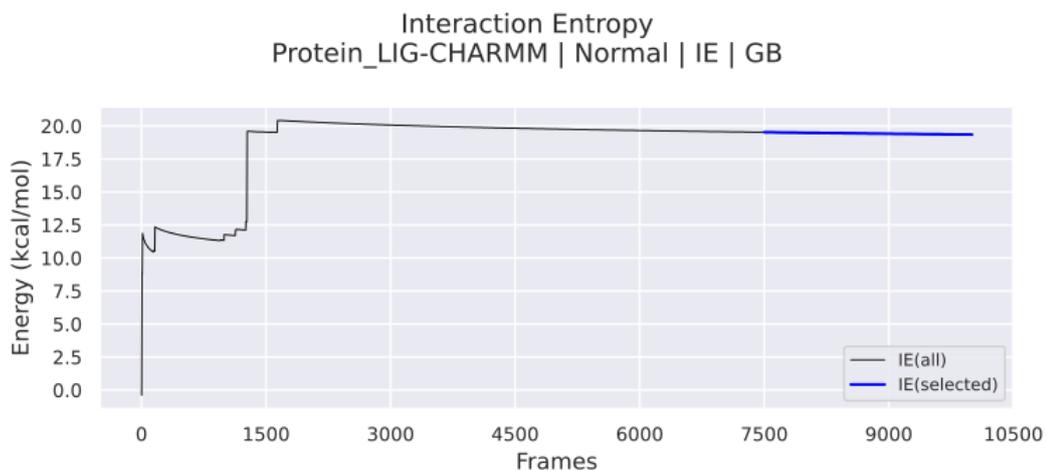
orlistat com a enzima 3HRH no crescimento dos valores, variando apenas o valor máximo alcançado.

Figura 59 – Entropia de interação da dinâmica 5VNS com THL hidrolisado com água no sítio catalítico ao longo do tempo



Fonte: Autoria própria.

Figura 60 – Entropia de interação da dinâmica 5VNS com THL hidrolisado sem água no sítio catalítico ao longo do tempo

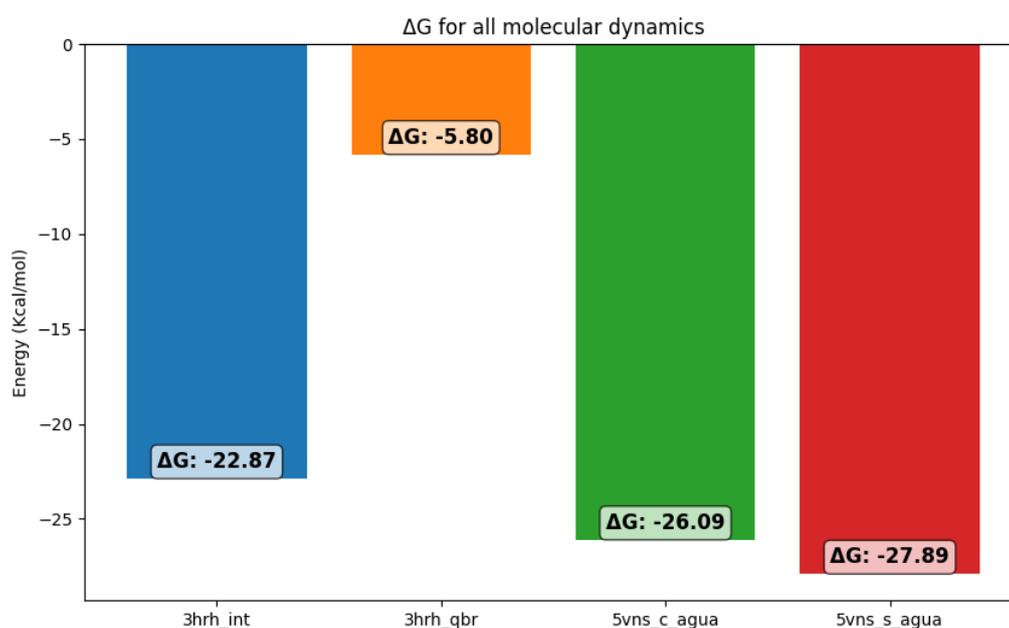


Fonte: Autoria própria.

5.5.2. Energia livre de Gibbs

A energia livre de Gibbs de forma geral obtiveram valores muito semelhantes entre si, entretanto para a enzima 3HRH com o THL hidrolisado a energia livre teve uma redução maior que 20 Kcal/mol, tendo sua energia livre próxima de zero, tornando a reação quase que inativa, mostrando que com a enzima nessa conformação caso o anel propriolactâmico esteja íntegro, sua espontaneidade de ligação é quase nula. Para as outras dinâmicas mesmo com valores próximos, na enzima 5VNS a reação foi ainda mais espontânea (Figura 61) (GILBERT et al., 2024).

Figura 61 - Energia livre de Gibbs (ΔG) para todas as dinâmicas realizadas com enzimas e o THL



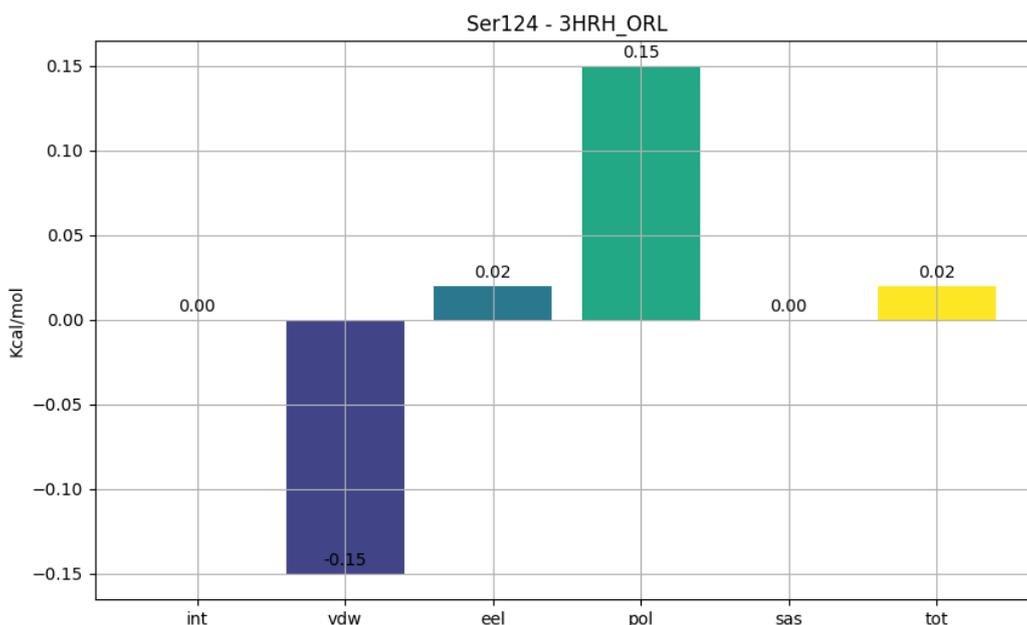
Fonte: Autoria própria.

5.5.3. Energia por aminoácido – Ser124

Quanto a enzima 3HRH não observamos valores significativos, sendo a maior distinção entre ambas o aumento da repulsão polar, enquanto na força íntegra do THL temos uma repulsão de 0.15 Kcal/mol (Figura 62), na forma hidrolisada a repulsão passa a 0.42 Kcal/mol (Figura 63). Mas para a enzima 5VNS temos valores mais expressivos, quando há a presença de água no “pocket” da enzima temos uma maior

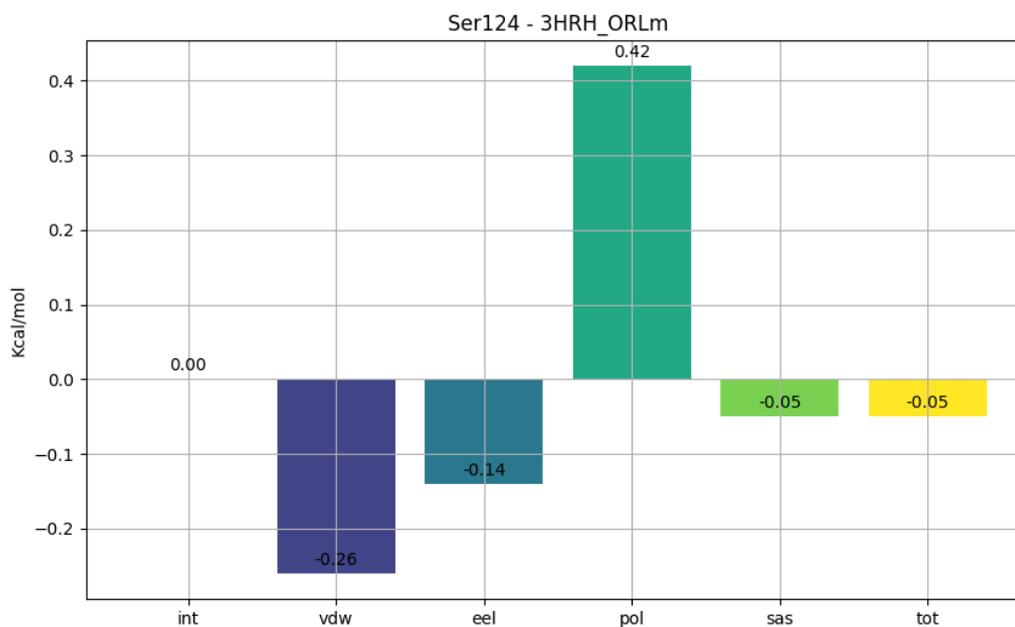
atração de Van der Waals e eletrostática (Figura 64) quando comparada a forma sem água no local (Figura 65), indicando que a água pode ter um papel importante para este aminoácido, uma vez que a Ser124 é capaz de modificar covalentemente determinados inibidores (BARRY et al., 2011).

Figura 62 - Energia por aminoácido do resíduo Ser124 da Ag85c (PDB 3HRH) e o Orlistat



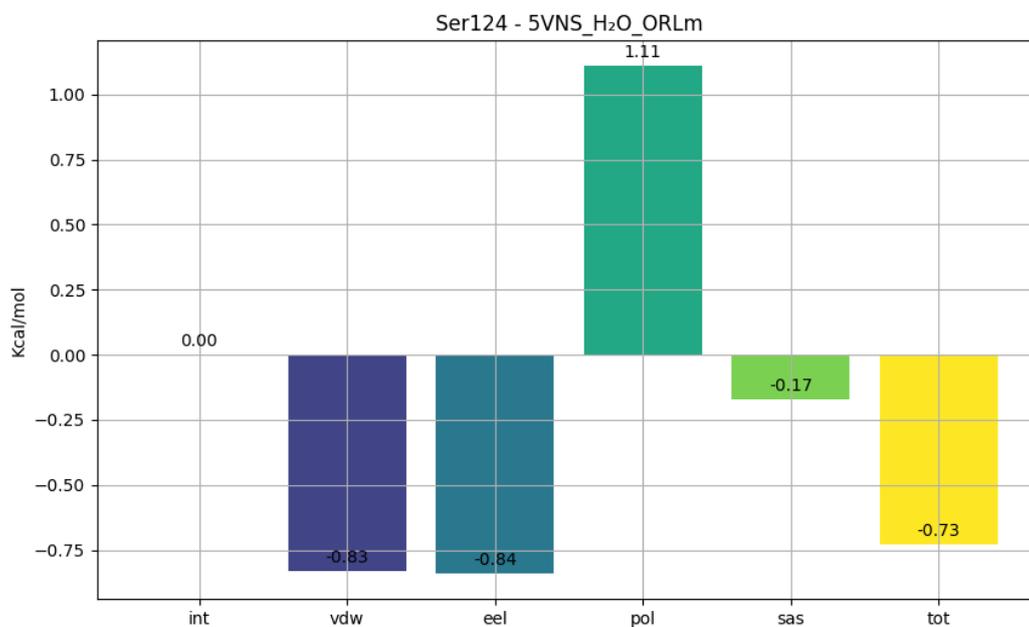
Fonte: Autoria própria. *int: Contribuição/Força de energia interna; vdw: Contribuição de Van der Waals, eel: Contribuição de energia eletrostática; pol: Contribuição da energia livre polar; sas: Contribuição da energia livre não-polar; tot: Total de contribuição das energias livres (“Python API - gmx_MMPBSA Documentation”, 2024).

Figura 63 - Energia por aminoácido do resíduo Ser124 da Ag85c (PDB 3HRH) e o Orlistat hidrolisado



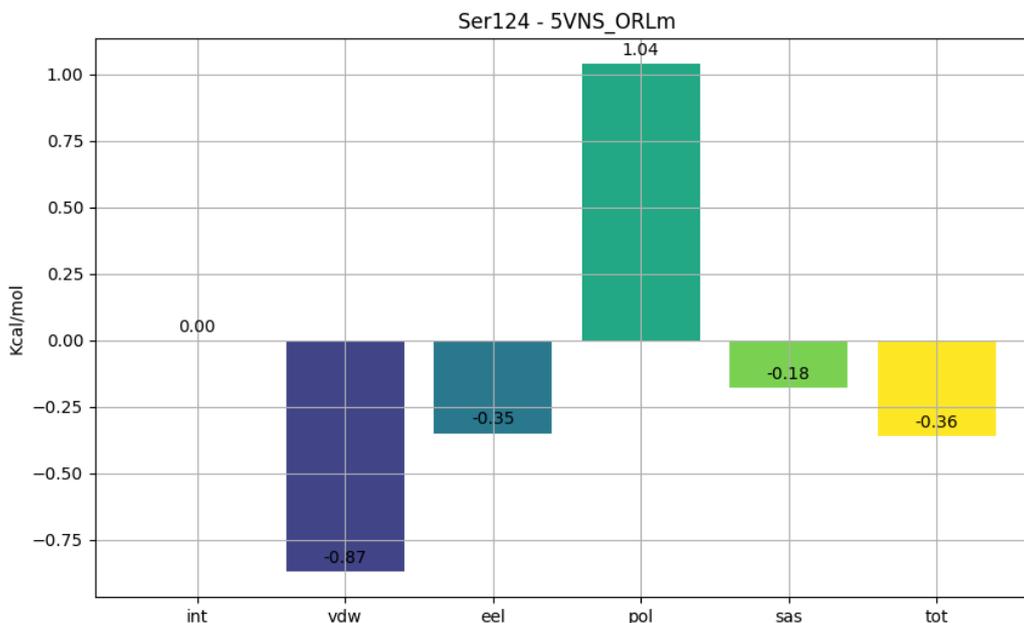
Fonte: Autoria própria. *int: Contribuição/Força de energia interna; vdw: Contribuição de Van der Waals, eel: Contribuição de energia eletrostática; pol: Contribuição da energia livre polar; sas: Contribuição da energia livre não-polar; tot: Total de contribuição das energias livres (“Python API - gmx_MMPBSA Documentation”, 2024).

Figura 64 - Energia por aminoácido do resíduo Ser124 da Ag85c (PDB 5VNS) e o Orlistat hidrolisado com água no sítio catalítico



Fonte: Autoria própria. *int: Contribuição/Força de energia interna; vdw: Contribuição de Van der Waals, eel: Contribuição de energia eletrostática; pol: Contribuição da energia livre polar; sas: Contribuição da energia livre não-polar; tot: Total de contribuição das energias livres (“Python API - gmx_MMPBSA Documentation”, 2024).

Figura 65 - Energia por aminoácido do resíduo Ser124 da Ag85c (PDB 5VNS) e o Orlistat hidrolisado sem água no sítio catalítico



Fonte: Autoria própria. *int: Contribuição/Força de energia interna; vdw: Contribuição de Van der Waals, eel: Contribuição de energia eletrostática; pol: Contribuição da energia livre polar; sas: Contribuição da energia livre não-polar; tot: Total de contribuição das energias livres (“Python API - gmx_MMPBSA Documentation”, 2024).

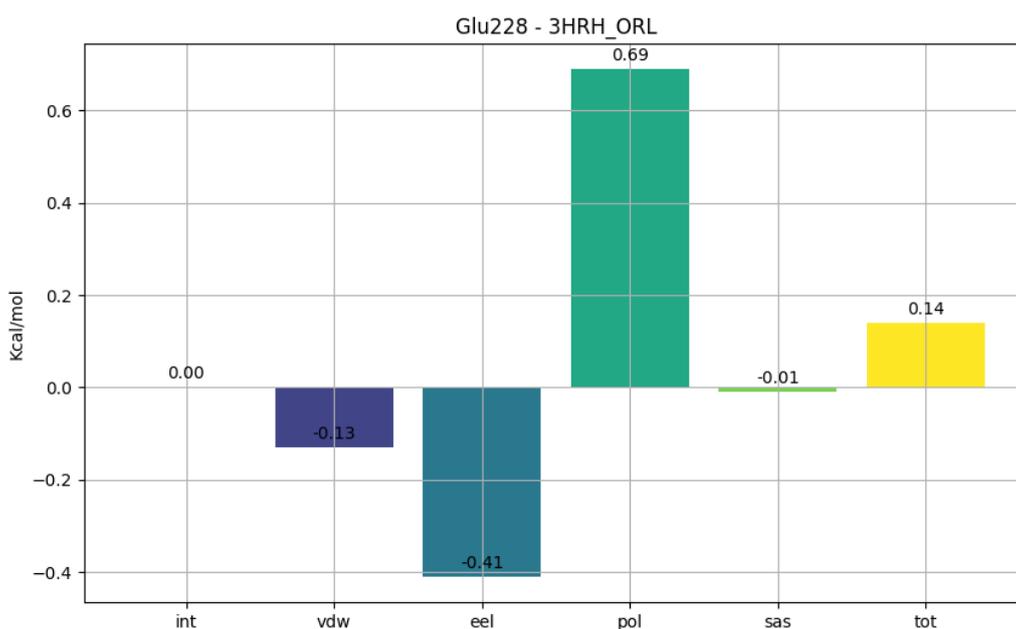
5.5.4. Energia por aminoácido – Glu228

Ao calcular energia em todas as dinâmicas se nota que para 3HRH com o THL íntegro há uma atração eletrostática de 0.41Kcal/mol entre o aminoácido e o ligante e uma repulsão polar de 0.69 Kcal/mol (Figura 66), que ao calcular o total não há alterações significativas uma vez que as forças se anulam, mas é curioso notar que para 3HRH com orlistat hidrolisado temos uma inversão nas forças, tendo uma repulsão eletrostática de 0.91 Kcal/mol e uma atração polar de 0.79 Kcal/mol, (Figura 67) resultando novamente em forças que no total se anulam.

Na 5VNS com água no sítio catalítico temos forças de atração eletrostática e repulsão polar, que ao calcular no total se anulam (Figura 68). Entretanto o dado mais expressivo aparece na força sem água presente no sítio, onde há uma forte repulsão polar de 3.24 Kcal/mol, onde mesmo com uma atração de Van der Waals e

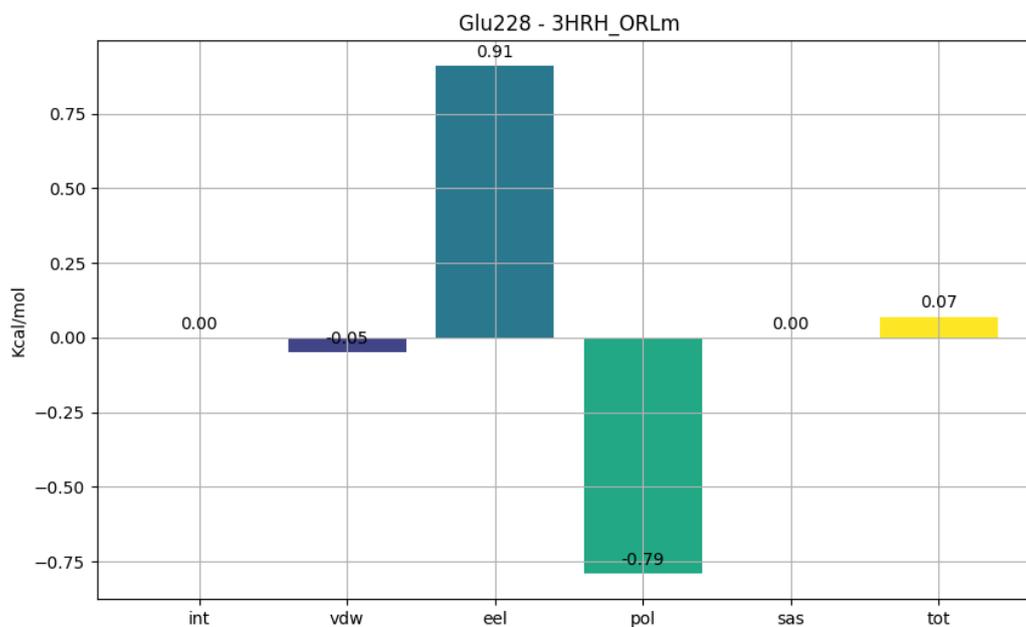
eletrostática não é o bastante para que no total haja uma repulsão em torno de 0.87 Kcal/mol (Figura 69), ilustrando que caso não haja água presente no local o THL passa a ter uma repulsão por esse resíduo de aminoácido, mas é importante lembrar que para Ser124 a água é importante para que haja atração entre o ligante e o resíduo em questão, portanto a água se faz necessária em determinados momentos.

Figura 66 - Energia por aminoácido do resíduo Glu228 da Ag85c (PDB 3HRH) e o Orlistat



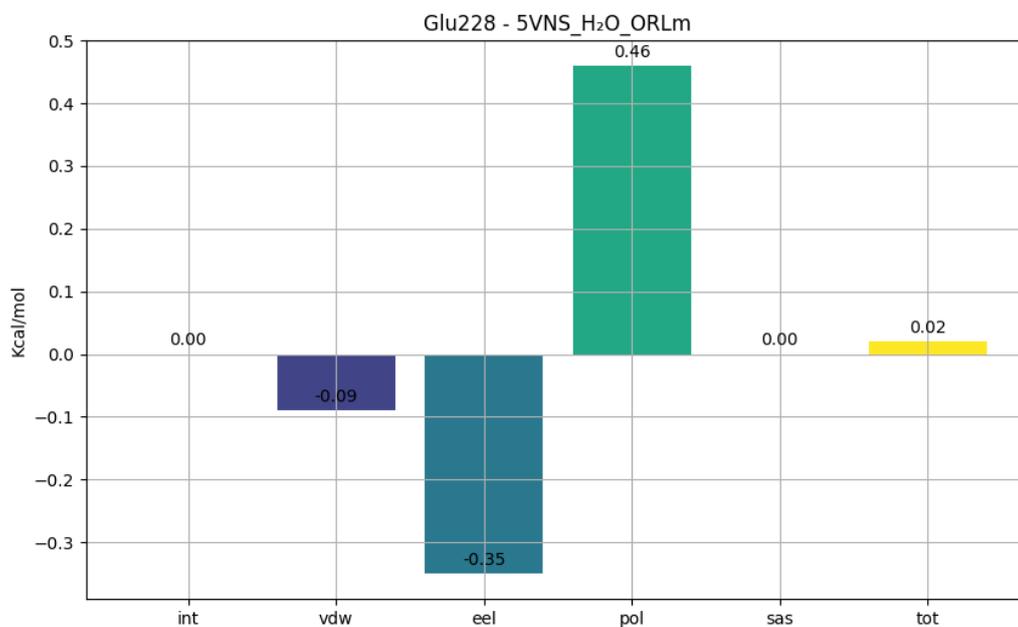
Fonte: Autoria própria. *int: Contribuição/Força de energia interna; vdw: Contribuição de Van der Waals, eel: Contribuição de energia eletrostática; pol: Contribuição da energia livre polar; sas: Contribuição da energia livre não-polar; tot: Total de contribuição das energias livres (“Python API - gmx_MMPBSA Documentation”, 2024).

Figura 67 - Energia por aminoácido do resíduo Glu228 da Ag85c (PDB 3HRH) e o Orlistat hidrolisado



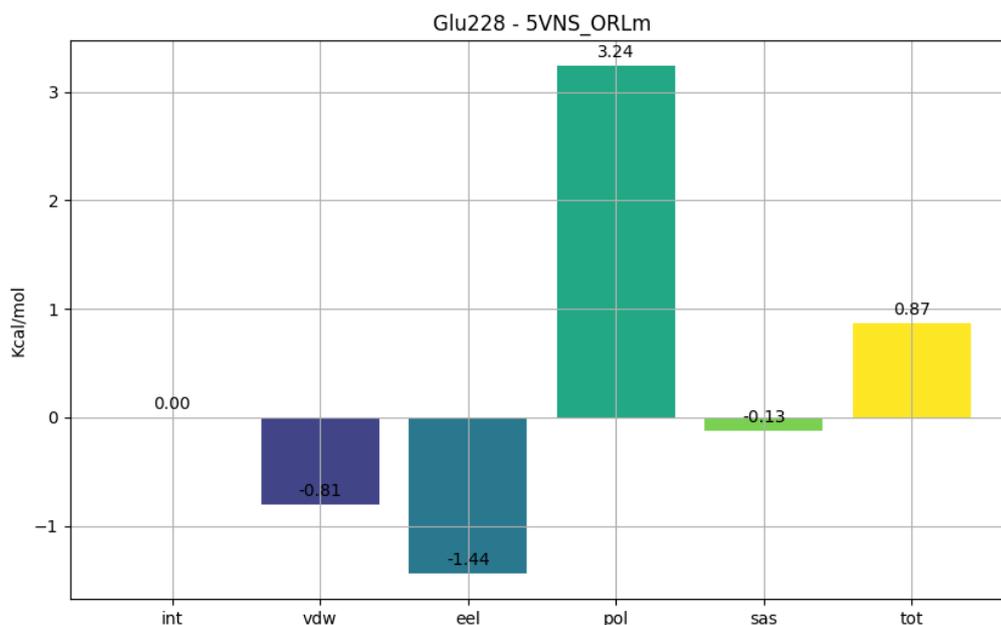
Fonte: Autoria própria. *int: Contribuição/Força de energia interna; vdw: Contribuição de Van der Waals, eel: Contribuição de energia eletrostática; pol: Contribuição da energia livre polar; sas: Contribuição da energia livre não-polar; tot: Total de contribuição das energias livres (“Python API - gmx_MMPBSA Documentation”, 2024).

Figura 68 - Energia por aminoácido do resíduo Glu228 da Ag85c (PDB 5VNS) e o Orlistat hidrolisado com água no sítio catalítico



Fonte: Autoria própria. *int: Contribuição/Força de energia interna; vdw: Contribuição de Van der Waals, eel: Contribuição de energia eletrostática; pol: Contribuição da energia livre polar; sas: Contribuição da energia livre não-polar; tot: Total de contribuição das energias livres (“Python API - gmx_MMPBSA Documentation”, 2024).

Figura 69 - Energia por aminoácido do resíduo Glu228 da Ag85c (PDB 5VNS) e o Orlistat hidrolisado sem água no sítio catalítico



Fonte: Autoria própria. *int: Contribuição/Força de energia interna; vdw: Contribuição de Van der Waals, eel: Contribuição de energia eletrostática; pol: Contribuição da energia livre polar; sas: Contribuição da energia livre não-polar; tot: Total de contribuição das energias livres (“Python API - gmx_MMPBSA Documentation”, 2024).

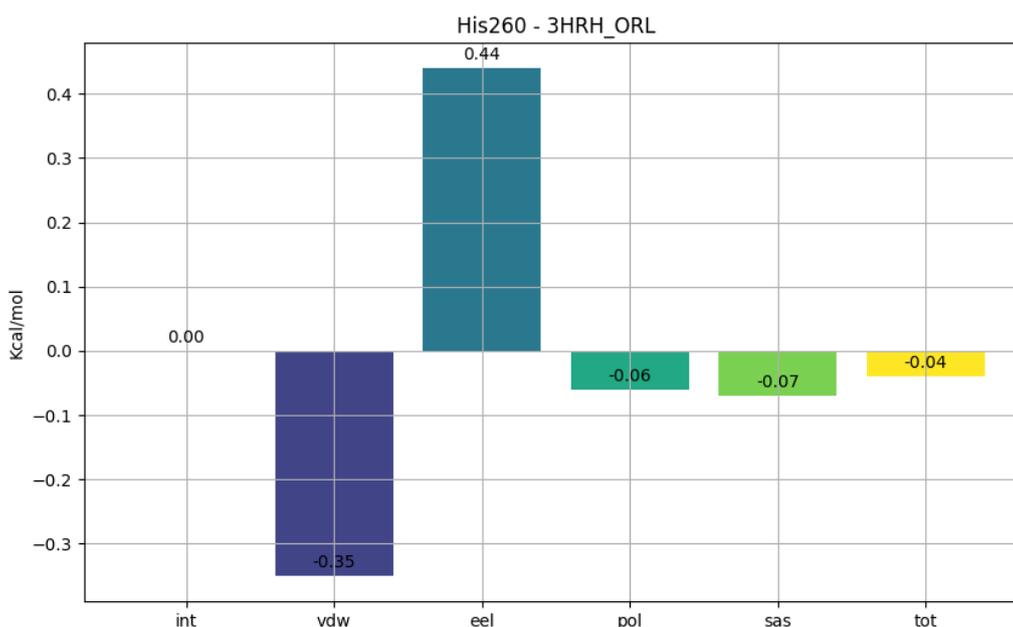
5.5.5. Energia por aminoácido – His260

Durante todas as dinâmicas com 3HRH observando apenas o valor total se nota que não houve valores expressivos, mas analisando cada força em cada gráfico quando temos o THL íntegro há uma atração relacionada a Van der Waals e uma repulsão eletrostática que se igualam numericamente (Figura 70), e o mesmo comportamento no que se refere as forças totais se repete para a forma com THL hidrolisado (Figura 71), sendo que a distinção se refere na atração eletrostática seguida de uma repulsão polar.

Para 5VNS em ambos os casos temos uma atração entre o THL e a enzima causada pela interação de Van der Waals com valores numéricos semelhantes, mas quando há a presença de água no sítio ocorre uma leve repulsão polar de 0.23 Kcal/mol (Figura 72) que não se repete quando se tem ausência de água no local

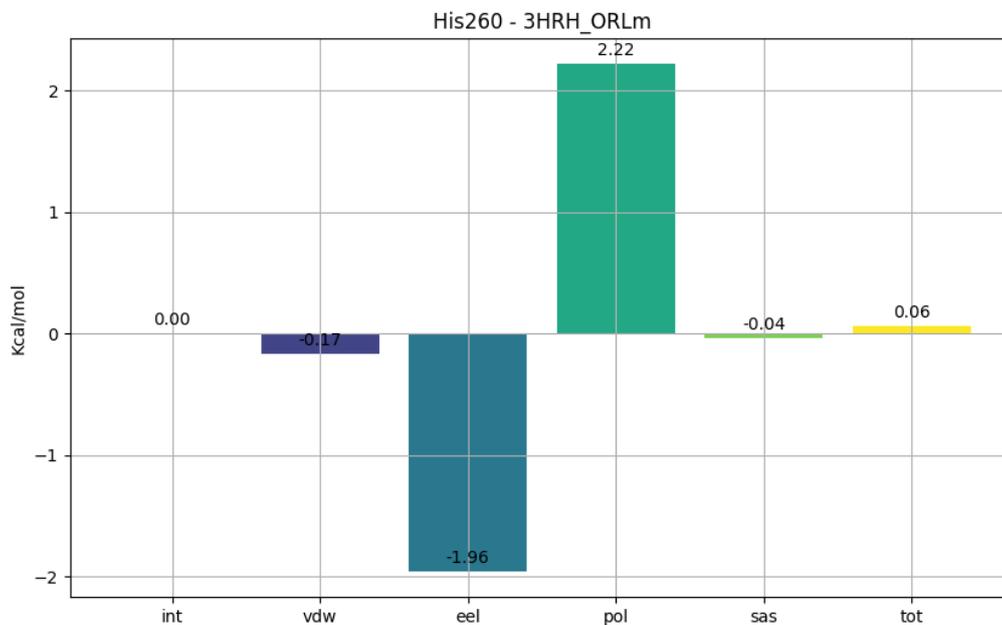
(Figura 73), resultando numa maior afinidade no total pela força sem água no sítio entre o resíduo e o THL. Há relatos de que a His260 na conformação catalítica é capaz de ativar moléculas de água para promover hidrólise do complexo acil-enzima (KHAN et al., 2021).

Figura 70 - Energia por aminoácido do resíduo His260 da Ag85c (PDB 3HRH) e o Orlistat



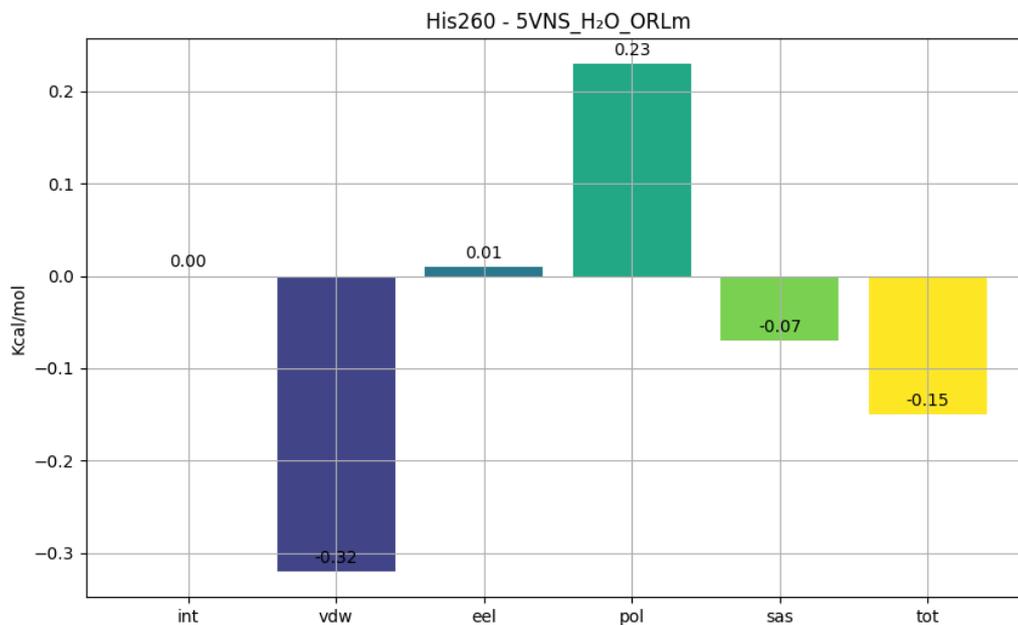
Fonte: Autoria própria. *int: Contribuição/Força de energia interna; vdw: Contribuição de Van der Waals, eel: Contribuição de energia eletrostática; pol: Contribuição da energia livre polar; sas: Contribuição da energia livre não-polar; tot: Total de contribuição das energias livres (“Python API - gmx_MMPBSA Documentation”, 2024).

Figura 71 Energia por aminoácido do resíduo His260 da Ag85c (PDB 3HRH) e o Orlistat hidrolisado



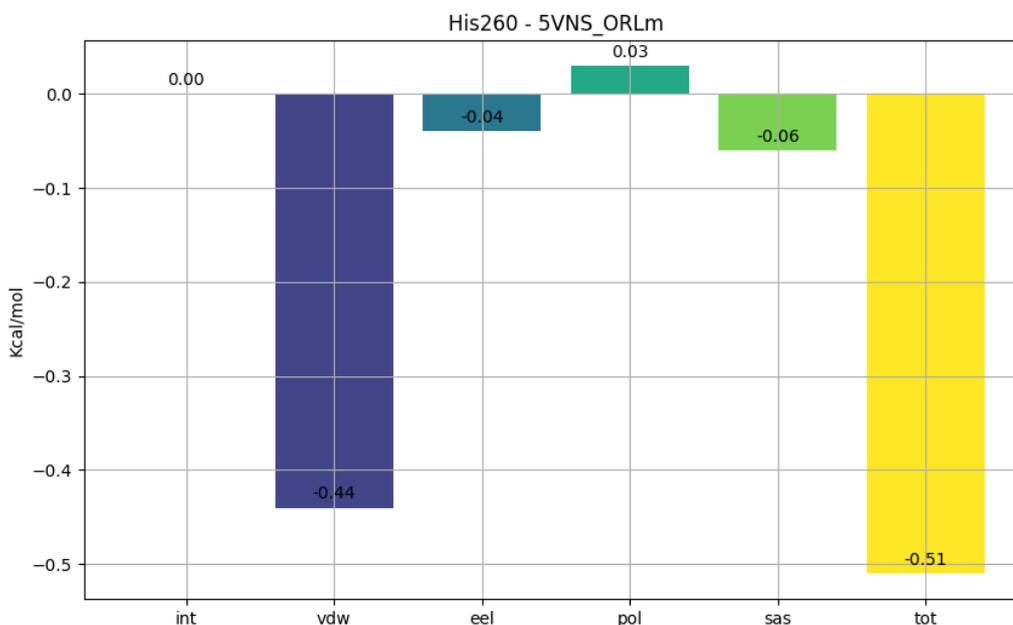
Fonte: Autoria própria. *int: Contribuição/Força de energia interna; vdw: Contribuição de Van der Waals, eel: Contribuição de energia eletrostática; pol: Contribuição da energia livre polar; sas: Contribuição da energia livre não-polar; tot: Total de contribuição das energias livres (“Python API - gmx_MMPBSA Documentation”, 2024).

Figura 72 - Energia por aminoácido do resíduo His260 da Ag85c (PDB 5VNS) e o Orlistat hidrolisado com água no sítio catalítico



Fonte: Autoria própria. *int: Contribuição/Força de energia interna; vdw: Contribuição de Van der Waals, eel: Contribuição de energia eletrostática; pol: Contribuição da energia livre polar; sas: Contribuição da energia livre não-polar; tot: Total de contribuição das energias livres (“Python API - gmx_MMPBSA Documentation”, 2024).

Figura 73 - Energia por aminoácido do resíduo Ser124 da Ag85c (PDB 5VNS) e o Orlistat hidrolisado sem água no sítio catalítico



Fonte: Autoria própria. *int: Contribuição/Força de energia interna; vdw: Contribuição de Van der Waals, eel: Contribuição de energia eletrostática; pol: Contribuição da energia livre polar; sas: Contribuição da energia livre não-polar; tot: Total de contribuição das energias livres (“Python API - gmx_MMPBSA Documentation”, 2024).

6. Conclusão

A análise das dinâmicas moleculares revelou informações cruciais sobre a estabilidade e a conformação da Ag85c na presença da tetrahidrolipstatina, sugerindo que essa interação pode interferir na função enzimática e, conseqüentemente, na virulência do *Mycobacterium tuberculosis*. Esses achados não apenas corroboram a relevância da tetrahidrolipstatina como um potencial agente terapêutico, mas também abrem novas avenidas para a pesquisa sobre inibidores enzimáticos.

A investigação sobre a interação entre a tetrahidrolipstatina e a enzima Ag85c do *Mycobacterium tuberculosis* revela insights significativos sobre a dinâmica molecular e a potencial eficácia terapêutica desse inibidor.

Além disso, a análise das dinâmicas moleculares ressaltou a importância da mudança conformacional enzimática para interação com ligante em questão, tendo implicações importantes na funcionalidade da Ag85c, uma vez que a estrutura da enzima é fundamental para sua atividade catalítica. A compreensão dessas mudanças estruturais é essencial para o desenvolvimento de inibidores mais eficazes, pois pode fornecer pistas sobre como a tetrahidrolipstatina e outros compostos podem ser projetados para se ligarem de maneira mais eficiente ao sítio ativo da enzima.

A continuidade da pesquisa pode se concentrar em estudos mais aprofundados sobre as ligações atômicas a nível de orbitais moleculares entre a tetrahidrolipstatina e a Ag85c, bem como na otimização do THL. A análise detalhada das interações atômicas pode revelar informações valiosas sobre como melhorar a afinidade e a especificidade do ligante, potencialmente levando ao desenvolvimento de novos fármacos que sejam mais eficazes no combate à tuberculose.

7. Referências bibliográficas

1. ABRAHAM, M. et al. GROMACS 2024.2 Manual. maio 2024.
2. ADEWUMI, A. T. et al. Weak spots inhibition in the Mycobacterium tuberculosis antigen 85C target for antitubercular drug design through selective irreversible covalent inhibitor-SER124. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, v. 40, n. 7, p. 2934–2954, 2022.
3. ALAME EMANE, A. K. et al. Drug resistance, fitness and compensatory mutations in Mycobacterium tuberculosis. *Tuberculosis*, v. 129, p. 102091, jul. 2021.
4. BARBERIS, I. et al. The history of tuberculosis: from the first historical records to the isolation of Koch's bacillus. *Journal of Preventive Medicine and Hygiene*, v. 58, n. 1, p. E9, 2017.
5. BARRY, C. S. et al. ESI-MS assay of M. tuberculosis cell wall antigen 85 enzymes permits substrate profiling and design of a mechanism-based inhibitor. *Journal of the American Chemical Society*, v. 133, n. 34, p. 13232–13235, 31 ago. 2011.
6. BARRY III, C. E. et al. Mycolic acids: structure, biosynthesis and physiological functions. *Progress in lipid research*, v. 37, n. 2–3, p. 143–179, 1998.

7. BERMAN, H. M. The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Research*, v. 28, n. 1, p. 235–242, 1 jan. 2000.
8. BROOKS, B. R. et al. CHARMM: The Biomolecular Simulation Program. *Journal of computational chemistry*, v. 30, n. 10, p. 1545–1614, jul. 2009.
9. CHARM++ and NAMD — WVU-RC 2023.10.11 documentation. , [2023.]. Disponível em: <https://docs.hpc.wvu.edu/text/609.CHARM++_NAMD.html>
10. DUBOS, R. J. .; ROSENKRANTZ, B. GUTMANN.; DUBOS, JEAN. *The white plague : tuberculosis, man, and society*. p. 277, 19961987.
11. FAKO, V. E.; ZHANG, J.-T.; LIU, J.-Y. Mechanism of Orlistat Hydrolysis by the Thioesterase of Human Fatty Acid Synthase. *ACS Catalysis*, v. 4, n. 10, p. 3444–3453, 3 out. 2014.
12. GILBERT, G. L. et al. *Checked by*. v. 22, p. 41, 2024.
13. *Global Tuberculosis Report 2023*. Disponível em: <<https://www.who.int/teams/global-tuberculosis-programme/tb-reports/global-tuberculosis-report-2023>>. Acesso em: 14 set. 2024.
14. GOINS, C. M. et al. Exploring Covalent Allosteric Inhibition of Antigen 85C from *Mycobacterium tuberculosis* by Ebselen Derivatives. *ACS Infectious Diseases*, v. 3, n. 5, p. 378–387, 12 maio 2017.
15. GOINS, C. M. et al. Mycolyltransferase from *Mycobacterium tuberculosis* in covalent complex with tetrahydrolipstatin provides insights into antigen 85 catalysis. *Journal of Biological Chemistry*, v. 293, n. 10, p. 3651–3662, mar. 2018a.
16. GOINS, C. M. et al. Characterization of Tetrahydrolipstatin and Stereoderivatives on the Inhibition of Essential *Mycobacterium tuberculosis* Lipid Esterases. *Biochemistry*, v. 57, n. 16, p. 2383–2393, 24 abr. 2018b.
17. HOMER, R. W. et al. SYBYL Line Notation (SLN): A Single Notation To Represent Chemical Structures, Queries, Reactions, and Virtual Libraries. *Journal of Chemical Information and Modeling*, v. 48, n. 12, p. 2294–2307, 22 dez. 2008.
18. HUNTER, J. D. Matplotlib: A 2D Graphics Environment. *Computing in Science & Engineering*, v. 9, n. 3, p. 90–95, 2007.

19. JONES, G. et al. Development and validation of a genetic algorithm for flexible docking¹. *Journal of Molecular Biology*, v. 267, n. 3, p. 727–748, abr. 1997.
20. KHAMIS, M. A.; GOMAA, W. Comparative assessment of machine-learning scoring functions on PDBbind 2013. *Engineering Applications of Artificial Intelligence*, v. 45, p. 136–151, out. 2015.
21. KHAN, S. S. et al. Total Synthesis of Tetrahydrolipstatin, Its Derivatives, and Evaluation of Their Ability to Potentiate Multiple Antibiotic Classes against Mycobacterium Species. *ACS Infectious Diseases*, v. 7, n. 10, p. 2876–2888, 8 out. 2021.
22. KUMAR, M. Mol2 file format explained for beginners (Cheminformatics Part 2). *ChemicBook*, fev. 2021. Disponível em: <<https://chemicbook.com/2021/02/20/mol2-file-format-explained-for-beginners-part-2.html>>
23. LEVITT, M. Protein folding by restrained energy minimization and molecular dynamics. *Journal of Molecular Biology*, v. 170, n. 3, p. 723–764, 5 nov. 1983.
24. MARRAKCHI, H.; LANÉELLE, M.-A.; DAFFÉ, M. Mycolic Acids: Structures, Biosynthesis, and Beyond. *Chemistry & Biology*, v. 21, n. 1, p. 67–85, jan. 2014.
25. MOYO, S. et al. Healthcare seeking patterns for TB symptoms: Findings from the first national TB prevalence survey of South Africa, 2017–2019. *PLOS ONE*, v. 18, n. 3, p. e0282125, 15 mar. 2023.
26. NAGPAL, P. et al. Long-range replica exchange molecular dynamics guided drug repurposing against tyrosine kinase PtkA of Mycobacterium tuberculosis. *Scientific Reports*, v. 10, n. 1, p. 4413, 10 mar. 2020.
27. OJHA, A. et al. GroEL1: A dedicated chaperone involved in mycolic acid biosynthesis during biofilm formation in mycobacteria. *Cell*, v. 123, n. 5, p. 861–873, 2 dez. 2005.
28. Overview - TCB Group. , [2006.]. Disponível em: <<https://www.ks.uiuc.edu/Overview/>>
29. PANDAS DEVELOPMENT TEAM, T. pandas-dev/pandas: Pandas. Zenodo, , abr. 2024. Disponível em: <<https://zenodo.org/doi/10.5281/zenodo.10957263>>
30. PARKER, S. K. et al. Mycobacterium tuberculosis Rv3802c Encodes a Phospholipase/Thioesterase and Is Inhibited by the Antimycobacterial Agent Tetrahydrolipstatin. *PLoS ONE*, v. 4, n. 1, p. e4281, 26 jan. 2009.

31. 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.
32. Python API - gmx_MMPBSA Documentation. Disponível em: <https://valdes-tresanco-ms.github.io/gmx_MMPBSA/dev/api/>. Acesso em: 17 set. 2024.
33. RAVINDRAN, M. S. et al. Targeting Lipid Esterases in Mycobacteria Grown Under Different Physiological Conditions Using Activity-based Profiling with Tetrahydrolipstatin (THL). *Molecular & Cellular Proteomics*, v. 13, n. 2, p. 435–448, fev. 2014.
34. RMSD e RMSF – OnlineBioinfo. Disponível em: <<https://onlinebioinfo.com/2022/02/01/rmsd-e-rmsf/>>. Acesso em: 15 set. 2024.
35. RUNNING, D. R. et al. Crystal structure of the secreted form of antigen 85C reveals potential targets for mycobacterial drugs and vaccines. *Nature Structural Biology* 2000 7:2, v. 7, n. 2, p. 141–146, fev. 2000.
36. SANKI, A. K. et al. Design, synthesis and biological evaluation of sugar-derived esters, α -ketoesters and α -ketoamides as inhibitors for *Mycobacterium tuberculosis* antigen 85C. *Molecular BioSystems*, v. 5, n. 9, p. 945–956, ago. 2009.
37. SHAH, M.; DORMAN, S. E. Latent Tuberculosis Infection. *New England Journal of Medicine*, v. 385, n. 24, p. 2271–2280, 9 dez. 2021.
38. TAKAYAMA, K.; WANG, C.; BESRA, G. S. Pathway to synthesis and processing of mycolic acids in *Mycobacterium tuberculosis*. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 18, n. 1, p. 81–101, jan. 2005.
39. TIMMINS, G. S.; DERETIC, V. Mechanisms of action of isoniazid. *Molecular Microbiology*, v. 62, n. 5, p. 1220–1227, 2006a.
40. TIMMINS, G. S.; DERETIC, V. Mechanisms of action of isoniazid. *Molecular Microbiology*, v. 62, n. 5, p. 1220–1227, 24 dez. 2006b.
41. VALDÉS-TRESANCO, M. S. et al. gmx_MMPBSA: A New Tool to Perform End-State Free Energy Calculations with GROMACS. *Journal of Chemical Theory and Computation*, v. 17, n. 10, p. 6281–6291, out. 2021.

42. VERLET, L. Computer “Experiments” on Classical Fluids. I. Thermodynamical Properties of Lennard-Jones Molecules. *Physical Review*, v. 159, n. 1, p. 98–103, 5 jul. 1967.
43. VILJOEN, A. et al. Cyclopostins and cyclophostin analogs inhibit the antigen 85C from *Mycobacterium tuberculosis* both in vitro and in vivo. *Journal of Biological Chemistry*, v. 293, n. 8, p. 2755–2769, 23 fev. 2018.
44. VISHWAKARMA, D. et al. Multi-Drug Resistance Tuberculosis (MDR-TB) Challenges in India: A Review. *Cureus*, 9 dez. 2023.
45. WEHRLI, W. Rifampin: Mechanisms of Action and Resistance. *Clinical Infectious Diseases*, v. 5, n. Supplement_3, p. S407–S411, 1 jul. 1983.
46. ZHANG, Y. et al. Mechanisms of Pyrazinamide Action and Resistance. *Microbiology Spectrum*, v. 2, n. 4, 15 ago. 2014.
47. ZHU, C. et al. Molecular mechanism of the synergistic activity of ethambutol and isoniazid against *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Biological Chemistry*, v. 293, n. 43, p. 16741–16750, out. 2018.
48. ZOETE, V. et al. SwissParam: A fast force field generation tool for small organic molecules. *Journal of Computational Chemistry*, v. 32, n. 11, p. 2359–2368, 2011.