

PROSPECÇÃO *in silico* DE COMPOSTOS DERIVADOS DA *Cannabis Sativa* COM POTENCIAL ATIVIDADE ANTIBACTERIANA FRENTE À TIMIDILATO QUINASE

Luciane B. Silva^{1,2}; Madson J. da Costa¹; Vitor H. d. S. Sanches²; Adnan E. M. Padilla²;
Cleydson B. R. dos Santos^{1,2}.

¹Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biodiversidade-Rede BIONORTE, UNIFAP, 68903-419, Macapá – Amapá, Brasil, e-mail luciaanebarros@hotmail.com; breno@unifap.br

²Laboratório de Modelagem e Química Computacional, Universidade Federal do Amapá, Rod. JK, KM 02, Macapá – Amapá, Brasil.
luciaanebarros@hotmail.com

Palavras-Chave: *Staphylococcus aureus*, compostos naturais, Docking Molecular.

Introdução

A resistência antimicrobiana é hoje um dos maiores desafios enfrentados pela saúde pública no mundo. Entre os microrganismos mais preocupantes está o *Staphylococcus aureus* resistente à vancomicina (VRSA), conhecido pela dificuldade de tratamento e pelas poucas opções terapêuticas eficazes disponíveis (ARANTES; CALDAS; ROSA; LELES *et al.*, 2023). Diante desse cenário, buscar novas substâncias capazes de inibir proteínas essenciais à resistência bacteriana, como a PBP2a, torna-se uma estratégia promissora para o desenvolvimento de alternativas contra infecções causadas por cepas resistentes (ASADPOUR; GHAZANFARI, 2019).

A timidilato quinase (TMK) é uma enzima fundamental na via de síntese do DNA bacteriano, catalisando a fosforilação do timidilato a difosfato de timidina (MARTÍNEZ-BOTELLA; BREEN; DUFFY; DUMAS *et al.*, 2012). Por esse motivo, a TMK tem sido amplamente explorada como alvo promissor na busca de novos agentes antibacterianos, especialmente contra cepas resistentes (OLIVEIRA; LIMA; SILVA; CRUZ *et al.*, 2023).

Os compostos bioativos de origem natural vêm despertando crescente interesse na pesquisa farmacêutica por sua diversidade estrutural e potencial terapêutico. Entre eles, metabólitos secundários derivados da *Cannabis sativa* têm demonstrado propriedades farmacológicas relevantes, incluindo efeitos anti-inflamatórios, antioxidantes e antimicrobianos (GUO; SONG; SUN; WANG *et al.*, 2020; OLIVEIRA; LIMA; SILVA; CRUZ *et al.*, 2023). Associar essa diversidade química à triagem *in silico* de novas moléculas representa uma abordagem eficiente e sustentável para acelerar a identificação de candidatos com potencial biológico (SANCHES; LOBATO; SILVA; DOS SANTOS *et al.*, 2024).

Dessa forma, o presente estudo propõe uma prospecção *in silico* de compostos naturais derivados da *Cannabis sativa* e de metabólitos oriundos da biodiversidade colombiana, particularmente da região do rio Magdalena, com o objetivo de identificar possíveis inibidores da timidilato quinase (TMK) de *Staphylococcus aureus* utilizando a bioquímicoinformática. Para fins comparativos, foram utilizados os antibióticos tetraciclina e omadaciclina como controles positivos. Os compostos selecionados foram avaliados quanto às suas propriedades farmacocinéticas (ADME/Tox), afinidade de ligação com a TMK e potencial atividade antibacteriana predita, empregando ferramentas bioquímicoinformáticas modernas para suporte à descoberta de novos agentes antimicrobianos.

Material e Métodos

Neste estudo, o conjunto de compostos incluiu tetraciclina (TEMPLATE) e omadaciclina como controles positivos e uma série de derivados canabinoides (LMQC1–LMQC6) obtidos por um conjunto de compostos a partir de uma base de dados de metabólitos naturais desenvolvida em colaboração com instituições de pesquisa da Colômbia, com ênfase em espécies vegetais da região do rio Magdalena, reconhecida por sua ampla biodiversidade.

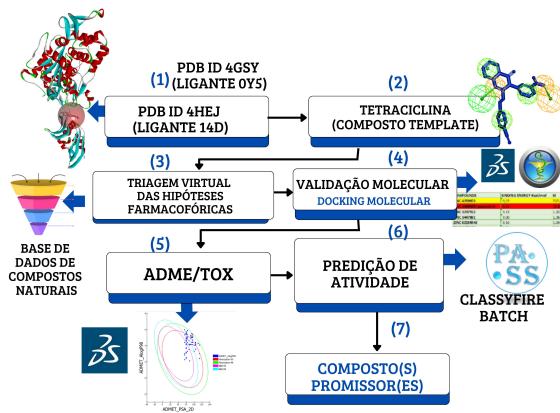
As moléculas foram otimizadas inicialmente por Mecânica Molecular (MM+), seguidas de otimização semi-empírica AM1 até convergência com $\text{RMS} \leq 0,05$, utilizando os algoritmos de gradiente conjugado (Polak–Ribiere/Fletcher–Reeves) disponíveis no HyperChem(BATISTA FERREIRA; CAMPOS ROSA; RODRIGUES DOS SANTOS, 2019). Para o alvo enzimático, empregaram-se estruturas cristalográficas da timidilato quinase (TMK) de *Staphylococcus aureus* (PDB IDs: 4GSY e 4HEJ).

As moléculas selecionadas foram submetidas a previsões farmacocinéticas e toxicológicas (ADME/Tox) por meio do software Discovery Studio (DS) e Derek, visando avaliar, de forma detalhada, propriedades relevantes para o desenvolvimento de fármacos. Esse processo permitiu estabelecer uma base sólida para a priorização de compostos promissores. Para as simulações da técnica de docking molecular, empregou-se o software AutoDock 4.2® (versão 4.2.6, San Diego, CA, EUA) em conjunto com o Discovery Studio® [6], seguindo o protocolo descrito por Sanches et al.(SANCHES; LOBATO; SILVA; DOS SANTOS *et al.*, 2024). O alvo biológico utilizado foi a timidilato quinase (TMK) de *Staphylococcus aureus*, cuja estrutura cristalográfica complexada com inibidor (PDB ID: 4GSY) foi obtida no Protein Data Bank (PDB).

Adicionalmente, utilizou-se a estrutura complementar da TMK (PDB ID: 4HEJ) para validação cruzada das interações e avaliação da consistência conformacional dos ligantes. O procedimento de redocking dos ligantes cristalográficos foi empregado para calibrar o protocolo de acoplamento, adotando-se o valor de $\text{RMSD} \leq 2,0 \text{ \AA}$ como critério de confiabilidade do método (RAMOS; MACêDO; COSTA; DA SILVA *et al.*, 2020).

Os compostos selecionados foram ainda classificados quanto à sua família química e estrutura hierárquica por meio da ferramenta ClassyFire, permitindo identificar relações estruturais entre os derivados da *Cannabis sativa* e os análogos das tetraciclinas. A Figura 1 ilustra o fluxo metodológico empregado para a prospecção dos compostos candidatos.

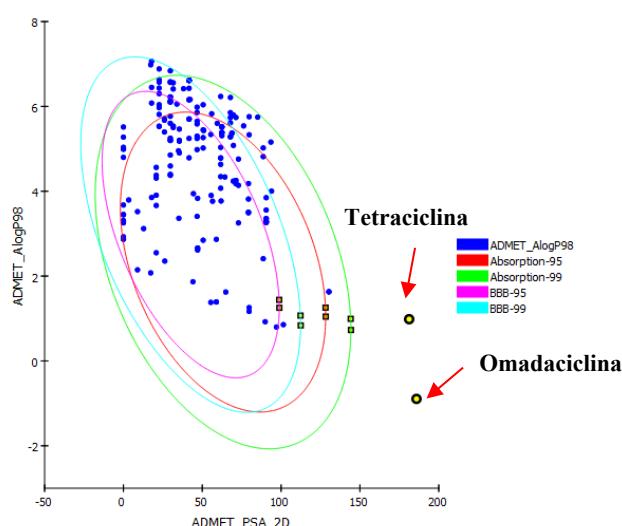
Figura 1- Fluxograma das etapas metodológicas



Resultados e Discussão

A tetraciclina, omadaciclina e 264 compostos de base natural derivados de *Cannabis sativa* foram submetidos à triagem inicial por propriedades farmacocinéticas *in silico*, avaliando parâmetros de absorção, distribuição, metabolismo e excreção (ADME). A etapa de filtragem resultou na seleção da tetraciclina, da omadaciclina e de 142 compostos da base natural que apresentaram conformidade com as regras de Lipinski e Veber, indicando potencial de biodisponibilidade oral e perfil farmacocinético adequado.

Figura 2- Gráfico de DMET PSA vs. ALogP98 para os compostos identificados, demonstrando as elipses de limites de confiança de 95% e 99% correspondentes aos modelos BBB e HIA.



Fonte: Autoria Própria

As previsões toxicológicas realizadas no software Derek Nexus® (Lhasa Limited, UK) indicaram que a tetraciclina apresentou hepatotoxicidade “certa” e a omadaciclina “plausível”, resultados coerentes com dados da literatura. Por outro lado, sete compostos da base natural não apresentaram alertas toxicológicos (“No alerts fired”), demonstrando baixo potencial de risco e alta segurança estrutural predita.

As estruturas dos compostos resultantes do ADME/Tox foram otimizadas inicialmente por Mecânica Molecular (MM+), seguida de refinamento semiempírico AM1, até convergência de RMS $\leq 0,05$, utilizando o algoritmo de gradiente conjugado (Polak–Ribiere/Fletcher–Reeves). Todos apresentaram convergência estável (CONV = SIM) e geometrias energeticamente consistentes.

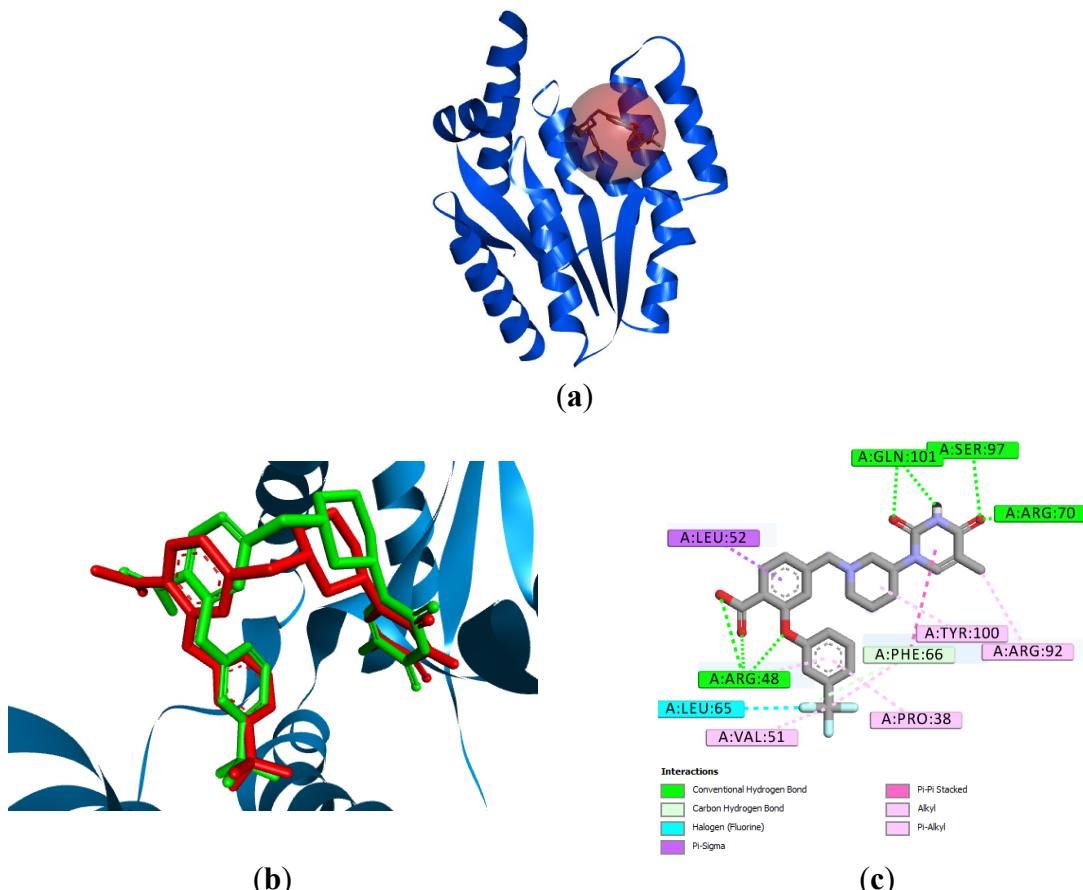
As energias totais (E, kcal/mol) indicaram boa estabilidade conformacional, destacando LMQC1 e LMQC5 com valores comparáveis aos controles tetraciclina e omadaciclina. O alinhamento estrutural (Molecular Overlay/ sobreposição Molecular) mostrou que esses compostos exibem alta similaridade espacial com os ligantes cristalográficos 0Y5 (PDB: 4GSY) e 14D (PDB: 4HEJ), confirmando adequação geométrica e coerência com os resultados da técnica de docking molecular, ver Tabela 1.

Tabela 1 - Resultados da otimização molecular (MM+/AM1) e alinhamento estrutural (Molecular Overlay)

COMPOSTOS	CONV = SIM (AM1)		ALINHAMENTO DE ESTRUTURA	
	E (kcal/mol)	Grad (RMS)	SOBREPOSIÇÃO MOLECULAR	
TETRACICLINA	-5920,2783	0,044	0,546244	0,523677
OMADACICLINA	-8262,8572	0,047	0,531132	0,470708
0Y5	-6448,2463	0,047	-	0,946816
14D	-6108,4488	0,047	0,598234	-
LMQC1	-6938,8781	0,045	0,474552	0,453308
LMQC2	-5751,8224	0,049	0,416194	0,453398
LMQC4	-2894,0398	0,033	0,377892	0,387812
LMQC5	-5868,8287	0,028	0,309222	0,353851
LMQC6	-5819,4395	0,046	0,415688	0,451672

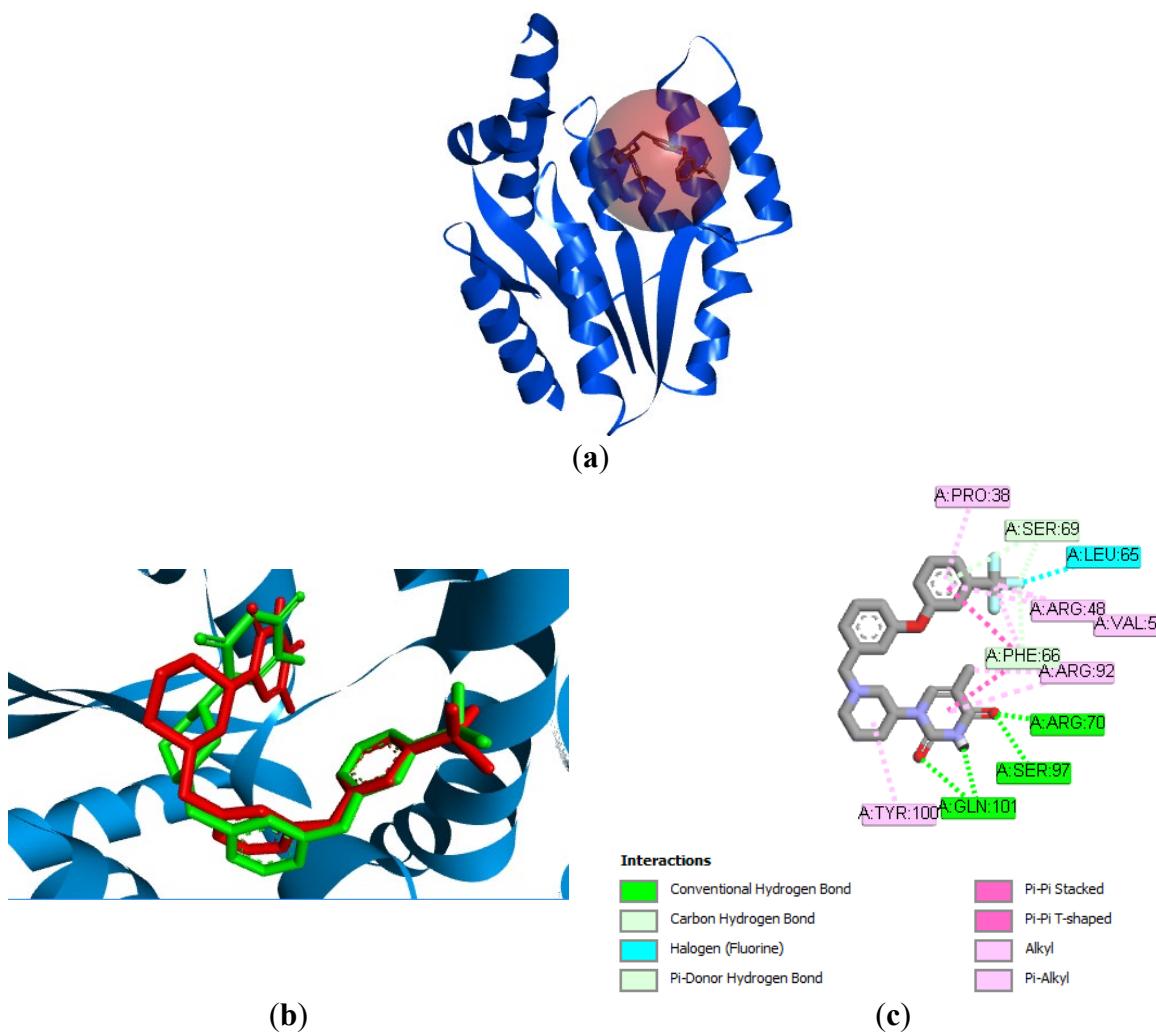
Os resultados da técnica de *docking molecular* confirmaram a capacidade dos compostos derivados da *Cannabis sativa* de se acomodarem de forma estável no sítio ativo da timidilato quinase (TMK) de *Staphylococcus aureus*, conforme ilustrado nas Figuras 3 e 4. A análise visual das poses de ancoragem demonstrou que os compostos priorizados apresentaram padrões de ligação semelhantes aos ligantes cristalográficos 0Y5 (PDB: 4GSY) e 14D (PDB: 4HEJ), utilizados como referências.

Figura 3- (a) Sítio Ativo de acordo com a posição de 0Y5. (b)Sobreposição de pose de ligante cristalográfico (em verde) com a pose teórica (em vermelho) PDB ID: 4GSY. (c) Interações em 2D entre o sítio ativo de TMK complexada com o composto 0Y5.



Os ligantes cristalográficos exibiram energias de ligação de $-7,93$ kcal/mol (4GSY) e $-8,67$ kcal/mol (4HEJ), servindo como parâmetros de comparação para os compostos testados. Entre os controles, a tetraciclina apresentou $-8,92$ kcal/mol e a omadaciclina $-8,67$ kcal/mol, confirmando a confiabilidade do protocolo e a calibração adequada do modelo. Entre os derivados naturais, LMQC1 ($-8,30$ kcal/mol) e LMQC5 ($-7,61$ kcal/mol) destacaram-se por exibirem afinidades comparáveis às dos ligantes cristalográficos e fármacos de referência, demonstrando interações favoráveis e estáveis com a cavidade catalítica da TMK, ver Figura 3 e Figura 4

Figura 4- (a) Sítio Ativo de acordo com a posição de 14D. **(b)** Sobreposição de pose de ligante cristalográfico (em verde) com a pose teórica (em vermelho) PDB ID: 4HEJ. **(c)** Interações em 2D entre o sítio ativo de TMK complexada com o composto 14D.



A inspeção das interações 2D e 3D revelou que LMQC1 forma pontes de hidrogênio com os resíduos ARG36, ASN100 e THR12, enquanto LMQC5 estabelece contatos hidrofóbicos e eletrostáticos com ARG36 e GLU39, em regiões coincidentes com o domínio catalítico ocupado pelos ligantes 0Y5 e 14D, ver Figura 5 e Figura 6.

Figura 5- Representação de interações em 2D do estudo de *docking molecular* para (a) LMQC1 e (b) LMQC5 na estrutura cristalina de 4GSY de TMK.

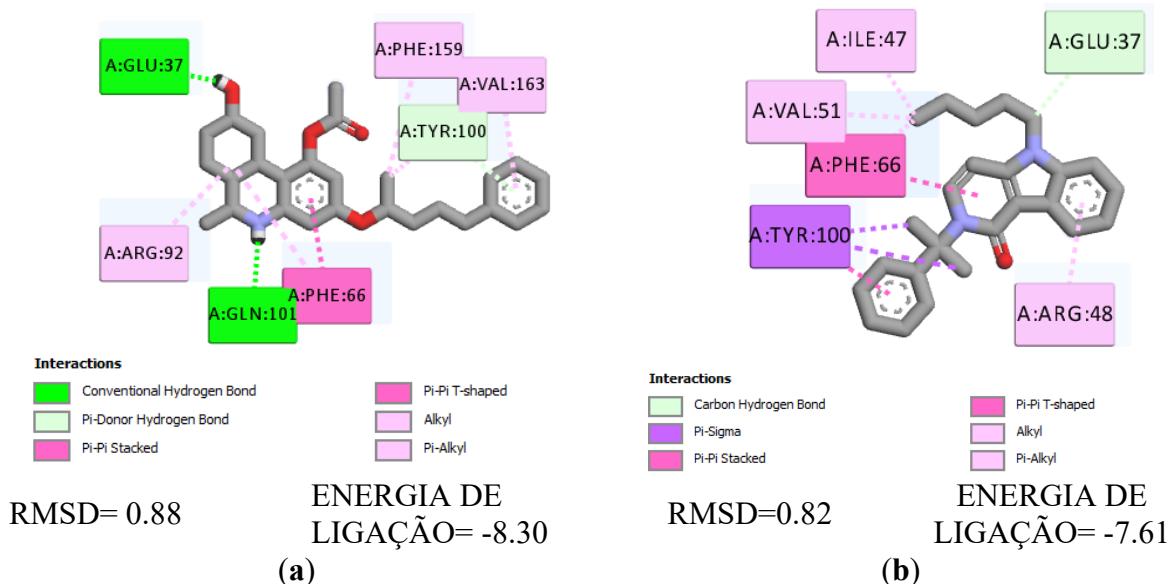
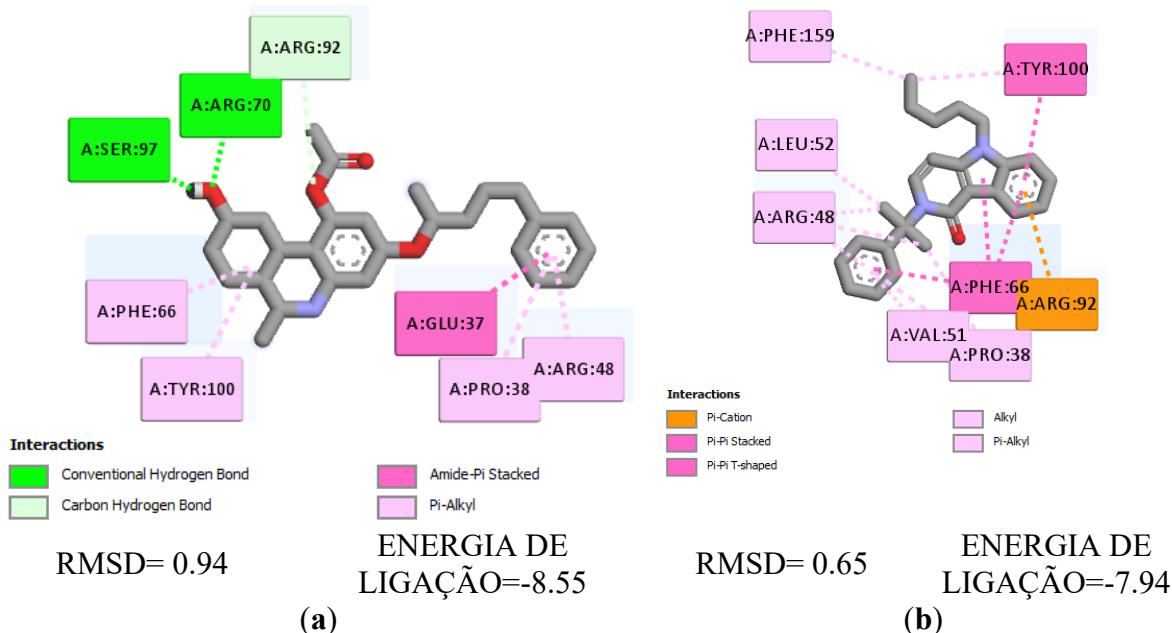


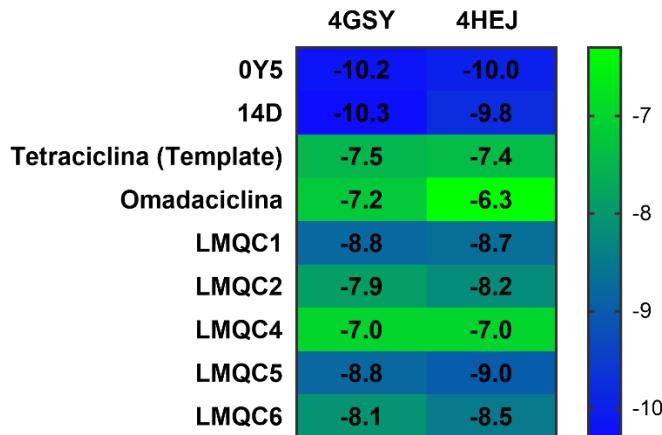
Figura 6- Representação de interações em 2D do estudo de *docking molecular* para (a) LMQC1 e (b) LMQC5 na estrutura cristalina de 4HEJ de TMK.



O mapa de afinidade (Heat Map) reforçou os resultados, destacando regiões de energia de ligação mais favoráveis (em azul escuro) para LMQC1 e LMQC5, o que corrobora os valores obtidos de energia e as interações observadas, ver Figura 7.

De modo geral, os resultados do *docking molecular* indicam que LMQC1 e LMQC5 apresentam perfil estereoeletrônico compatível com inibidores da timidilato quinase, sustentados por afinidade energética significativa, estabilidade conformacional e ausência de alertas toxicológicos críticos. Esses resultados sugerem que tais moléculas podem atuar como candidatos promissores no desenvolvimento de novos agentes antibacterianos contra cepas resistentes de *Staphylococcus aureus*.

Figura 7- Análise do Heat Map da Afinidade de ligação dos compostos resultantes da base de dados do modelo para TMK (PDB ID: 4GSY e PDB ID= 4HEJ). Na régua de gradiente, a cor azul representa uma forte afinidade de Ligação, enquanto na cor verde indica fraca afinidade de ligação.



A predição de atividades biológicas foi realizada utilizando o software PASS online (*Prediction of Activity Spectra for Substances*) (POROKOV; FILIMONOV; IHLENFELDT; GLORIOZOVA *et al.*, 2003), que fornece duas probabilidades: Pa (probabilidade de ser ativo) e Pi (probabilidade de ser inativo).

Conforme apresentado na Tabela 2, os controles tetraciclina (Pa = 0,605) e omadaciclina (Pa = 0,566) exibiram as maiores probabilidades de atividade antibacteriana. Entre os compostos naturais, LMQC1 (Pa = 0,160) apresentou o melhor desempenho, seguido por LMQC2 e LMQC4, indicando potencial moderado de atividade.

Apesar dos valores inferiores aos fármacos de referência, os resultados sugerem possibilidade de otimização estrutural, especialmente para LMQC1, além de boa segurança toxicológica, reforçando sua viabilidade como candidato promissor para estudos futuros.

Tabela 2- Predição da atividade biológica para compostos resultantes da triagem virtual.

COMPOSTO	SMILES	Antibacteriano	
		Pa	Pi
TETRACICLINA	CC1(O)C2CC3C(=C(O)C(=C(O)C3(O)C(=O)C2=C(O)C4=CC1C=CC=C4O)C(N)=O)[N](=C)=C	0,605	0,009
OMADACICLINA	[H][C@@@]12CC3=C(C=C(CNCC(C)(C)C)C(O)=C3C(=O)C1=C(O)[C@]1(O)C(=O)C(C(N)=O)=C(O)[C@@@H](N(C)C)[C@]1([H])C2)N(C)C	0,566	0,011
LMQC1	CC(CCCC1=CC=CC=C1)OC2=CC3=C(C4CC(O)CCC4C(=O)N3)C(=C2)OC(C)=O	0,160	0,155
LMQC2	CO[C@H]1C(=O)C(=O)C1=C[N]1CC2=CC=C(F)C=C2)C3=C1C=CC=C3C(C)C	0,126	0,073
LMQC4	NC(CC1=C[NH]C2=CC=CC=C12)C(O)=O	0,138	0,080
LMQC5	CCCCC[N]1C2=C(C=CC=C2)C3=C1C=C[N+](=C3[O-])C(C)C)C4=CC=CC=C4	-	-
LMQC6	CC(C)(C)C(=O)C1=C[N]1(CC2=CC=C(F)C=C2)C3=C1C=CC=C3C(N)=O	0,117	0,116

Fonte: Autoria Própria

Após as etapas metodológicas, dois compostos com resultados mais promissores (conforme mostrado nas Figuras 5 e 6) identificados por triagem virtual no servidor, foram

submetidos a uma busca no SciFinder®, disponível no Chemical Abstract Service (CAS) (<https://scifinder.cas.org/>). Nenhum estudo referente a uma possível atividade biológica, foco deste trabalho, foi identificado.

Conclusões

Os resultados obtidos neste estudo demonstram que a abordagem *in silico* empregada foi eficaz na identificação de compostos naturais derivados da *Cannabis sativa* com potencial atividade antibacteriana frente à timidilato quinase (TMK) de *Staphylococcus aureus*. A avaliação ADME/Tox indicou boas propriedades farmacocinéticas e ausência de alertas toxicológicos relevantes, enquanto as etapas de otimização molecular (MM+/AM1) e a técnica de docking molecular revelaram afinidades de ligação comparáveis às dos ligantes cristalográficos e fármacos de referência.

Entre os compostos avaliados, LMQC1 e LMQC5 destacaram-se por apresentarem geometrias estáveis, energia de ligação favorável e interações consistentes com resíduos catalíticos da TMK. A análise PASS online reforçou o potencial biológico de LMQC1, que exibiu probabilidade de atividade antibacteriana superior aos demais derivados testados.

Dessa forma, o presente trabalho evidencia o potencial da bioprospecção computacional de metabólitos naturais da *Cannabis sativa* como estratégia promissora para a descoberta de novos candidatos a inibidores antibacterianos, contribuindo para o avanço de pesquisas voltadas ao enfrentamento da resistência antimicrobiana de TMK. Esses compostos serão avaliados em futuras validações experimentais *in vitro* e *in vivo*.

Agradecimentos

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) e aos membros do LMQC.

Referências

ARANTES, L. O.; CALDAS, E. R.; ROSA, S. A.; LELES, A. C. R. *et al.* Prevenção de infecções por microrganismos multirresistentes em serviços de saúde: uma revisão de literatura. **Brazilian Journal of Development**, 9, n. 7, p. 21227-21243, 2023.

ASADPOUR, L.; GHAZANFARI, N. Detection of vancomycin nonsusceptible strains in clinical isolates of *Staphylococcus aureus* in northern Iran. **International Microbiology**, 22, p. 411-417, 2019.

BATISTA FERREIRA, E. F.; CAMPOS ROSA, J. M.; RODRIGUES DOS SANTOS, C. B. Identification of New Inhibitors with Potential Antitumor Activity from Polypeptide Structures via Hierarchical Virtual Screening. 2019.

GUO, Y.; SONG, G.; SUN, M.; WANG, J. *et al.* Prevalence and Therapies of Antibiotic-Resistance in *Staphylococcus aureus*. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, 10, 2020. Review.

MARTÍNEZ-BOTELLA, G.; BREEN, J. N.; DUFFY, J. E. S.; DUMAS, J. *et al.* Discovery of Selective and Potent Inhibitors of Gram-Positive Bacterial Thymidylate Kinase (TMK). **Journal of Medicinal Chemistry**, 55, n. 22, p. 10010-10021, 2012/11/26 2012.

OLIVEIRA, L. P. S.; LIMA, L. R.; SILVA, L. B.; CRUZ, J. N. *et al.* Hierarchical Virtual Screening of Potential New Antibiotics from Polyoxygenated Dibenzofurans against *Staphylococcus aureus* Strains. **Pharmaceuticals**, v.16, n. 10, DOI: 10.3390/ph16101430.

POROIKOV, V. V.; FILIMONOV, D. A.; IHLENFELDT, W.-D.; GLORIOZOVA, T. A. *et al.* PASS biological activity spectrum predictions in the enhanced open NCI database browser. **Journal of chemical information and computer sciences**, 43, n. 1, p. 228-236, 2003.

RAMOS, R. S.; MACÊDO, W. J. C.; COSTA, J. S.; DA SILVA, C. H. T. D. P. *et al.* Potential inhibitors of the enzyme acetylcholinesterase and juvenile hormone with insecticidal activity: Study of the binding mode via docking and molecular dynamics simulations. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics**, 38, n. 16, p. 4687-4709, 2020.

SANCHES, V. H. D. S.; LOBATO, C. C.; SILVA, L. B.; DOS SANTOS, I. V. F. *et al.* Rational Approach to New Chemical Entities with Antiproliferative Activity on Ab1 Tyrosine Kinase Encoded by the BCR-ABL Gene: An Hierarchical Biochemoinformatics Analysis. **Pharmaceuticals**, v.17, n. 11, DOI: 10.3390/ph17111491.