



Prospecção de inibidores enzimáticos da proteína VP40 a partir de derivados da *Catharanthus roseus*

Kayron M. Conceição¹ Marta B. C. Rocha²; Pedro Alberto Pavão Pessoa³; Fatima Maria de Souza Pereira⁴.

1 Estudante do Curso de Licenciatura em Química do IFMA do Campus Caxias

2 Professora e Mestra Orientadora

3 Coordenador do Curso de Licenciatura em Química do IFMA do Campus Caxias

4 Doutora e Técnica Administrativa do IFMA do Campus Caxias

kayron.c@acad.ifma.edu.br

Palavras-Chave: ~~Palavras-Chave:~~ Fármaco, Docking molecular, Ebola vírus.

Introdução

A Doença pelo Virus Ebola (DVE), foi declarado pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como uma Emergência de Saúde Pública de Importância Internacional (ESPII), e sem alternativas de fármacos viáveis para neutralização da doença. Assim, surge a necessidade de estudos in silico voltados afim de se criar uma prospecção entre ligantes e proteína alvo. O Ebola Vírus como citado, é um vírus RNA de fita simples com sentido negativo pertencente a família Filoviridae, teve sua origem em 1976 em duas regiões distintas do continente Africano, na Republica Democrática do Congo (DRC), antigo Zaire, e no Sudão do Sul, devido a descoberta da cepa em Zaire foi recebido o nome de Ebola em menção ao rio Ebola, nome esse recebido pelo vírus (BISMWA et al., 2022). Essa doença, até hoje presente com diversos casos registrados, a mais devastadora registrada no período de 2013-2016, que gerou 28.652 casos de pacientes infectados pela doenças ocasionando em 11.325 mortos (OHIMAIN; OLU, 2021), assim, mostra-se um grande problema, por causa, certamente, de não haver um não tratamento eficaz contra a doença e, além disso, está localizado em regiões pobres e com quase inexistente saneamento básico do continente Africano.

O DVE não é único, além do vírus ebola (Zaire Ebolavirus), apresenta mais 4 espécies, Vírus Sudão (Sudão Ebolavirus), Vírus Forest (Tai Forest Ebolavirus), virus Bundibugyo (Bundigyo Ebolavirus) e vírus Reston (Reston Ebolavirus), esse último registrado em primatas no Estados Unidos (USA) é o que apresenta menor letalidade em ser humano, com registro de infecção em apenas animais. Sua transmissão se da por meio de



animais infectados, como primatas e morcegos frugívoros, apontado como um dos principais transmissores da doenças, após contato com algum infectado, primeiramente, haverá um período de incubação de 1 a 21 dias, que nesse primeiro momento a doença não se manifestará, após isso a doença aparecera em forma de febre, que posteriormente evoluirá para diarreia hemorrágica, náuseas e vômitos (OMS). Dentro desse período, o paciente se torna um perigo, por causa que uma vez contaminado, todos os seus fluidos corporais, seja suor, urina, secreções também se encontram contaminados (BISMWA et al., 2022).

Nesse sentido, a *Catharanthus roseus* (L.) G. Don, popularmente conhecida como vinca, vinca de madagascar, boa-noite, dentre outros nomes, é uma planta da família Apocinaeae, originaria da ilha de madagascar mas que é bastante adaptativa a climas tropicais 2 e subtropicais, como o caso do Brasil. Ainda mais, essa planta possui diversos alcaloides que ajudam no tratamento de doenças, como a leucemia. (ARAUJO et. al., 2018). Dentro dessa planta está presente dentre 100 à 90 tipos diferentes de alcaloides que ao serem extraídos podem gerar diversos fármacos e por conseguinte benefícios farmacológicos ao ser humano. Dentre esses alcaloides, pode-se citar a vincristina e a vimblastina, responsáveis fundamentalmente em papéis cancerígenos.

Sua origem se deu devido ao seu uso medicinal em território indiano, no qual era comumente ligado a doenças como malária, picadas de inseto, diabetes, etc, devido a isso, surgiu a necessidade do estudo dos efeitos dessa planta e como elas reagiam com essas doenças. Assim, em 1952, o Dr, Clark Noble após recebe de um paciente jamaicano essas folhas de vinca, em que o mesmo explicou que em seu país era utilizado para fins medicinais como tratamento de diabetes, o Dr. Robert Noble, irmão de Clark Noble ao pesquisar a fundo a respeito dessa planta notou que as folhas da planta apresentavam uma redução de glóbulos brancos, sendo assim uma possível luz para o tratamento contra a leucemia. No entanto, como observado o uso medicinal como a produção de chá é de certo modo benéfico para o auxílio de doenças, no entanto o o consumo excessivo desse chá, por causa de sua toxicidade. (CORDEIRO, 2019).

O objetivo dessa pesquisa é prospectar possíveis ligantes capazes de inibir o sítio ativo da VP40 por meio de suas energias de interação, e além disso investigar suas características farmacocinéticas e farmacológicas pro meio de parâmetros ADMET.

Material e Métodos



Para realização dos testes *in silico*, será utilizado o método de Molecular Docking, Docking, ou ancoragem molecular, se tratará de um estudo entre a interação do ligante com sítio de ligação da proteína alvo (GODOY, 2021), nesse caso os alcaloides derivados da *Catharanthus roseus* (L.) G. Don com o sítio ativo da VP40, presente nos estágios virais da doença do Ebola Vírus. Primeiramente antes da realização de AutoDock, é necessário as estruturas tanto dos ligantes quanto do receptor. Nesse caso, utilizando a base de dados online PubChem Open Chemistry Database, obteve-se as moléculas, alstonine, catharanthine, coronaridine, 3 lochneridine, perivine, tabersonine, vallesiachotamine, venalstonine, vincadifformine e vinervine provenientes da planta *Catharanthus roseus*. Em seguida, para a estrutura da proteína utilizou-se a plataforma online Protein Data Bank (PDB), no qual no presente estudo optou-se pela estrutura cristalizada da VP40 obtida pelo método de difração de raio-X a 2,46 Å (PDB ID: 7JZJ). Para a realização de docagem molecular, foi utilizado o software AutoDock Tools em sua versão 4.2, e posteriormente para a leitura e possível visualização das interações do complexo com os aminoácidos os aplicativos Discovery Studio e *LigPlot+*. Assim, com a proteína já adicionada, foi feita adição de hidrogênios polares e cargas de Kollman equivalente a -5,482.

Logo após, com proteína e ligante alvo já presentes, necessitou-se fazer a delimitação do sítio ativo do receptor por meio do gridbox (caixa de grade), no qual utilizou-se as seguintes coordenadas, $x = -67.145$; $y = 27.149$; $z = 19.107$ com tamanho cúbico de 40x40x40 para todas as 10 ancoragens envolvendo a proteínas as moléculas. No processo de docagem, os parâmetros de pesquisa utilizado foi o de algoritmo genético Lamarckiano (LGA), no qual definiu-se um número de 100 execuções, cujo os formatos salvos e gerados pelo programa resultaram em arquivos “glg” e “dlg”, capazes de realizar as análises dos resultados tanto do autogrid quanto do autodock.

Na realização de testes farmacocinéticos e farmacológicos utilizou-se a plataformas online SwissADME e pkCSM. Os testes foram executados em todas os 10 alcaloides derivados da planta por meio de seus respectivos códigos SMILES obtidos no site PubChem o que gerou parâmetros como ensaio de permeabilidade em células Caco2; absorção intestinal humana; Barreira hematoencefálica; probabilidades de atividades Antivirais (Rhinovirus, Picornavirus, Influenza, Adenovirus); Ensaio de Mutagenicidade e Carcinogenicidade, e de



segurança (hERG canal de K); Ligação a proteínas plasmáticas; atividades Antiinflamatória, Antioxidante, propriedades Antimutagenica e Anticarcinogenica.

Resultados e Discussão

Após a realização das dez dockagens entre as moléculas e a macromolécula-alvo, apenas duas se apresentaram satisfatórias, tanto para a energia livre de Gibbs ($\Delta G_{\text{ligante}}$) e energia de inibição (K_i).

Tabela 1 – energias de Gibbs ($\Delta G_{\text{ligante}}$) e energia de inibição (K_i) dos complexos

Ligantes	ΔG (kcal · mol ⁻¹)	K_i (mol/L)
Alstonine	-7,37	3,99 x 10 ⁻⁶
Catharanthine	-7,86	1,72 x 10 ⁻⁶
Coronaridine	-6.28	24,83 x 10 ⁻⁶
Lochneridine	-7.36	4,05 x 10 ⁻⁶
Perivine	-6.20	28,76 x 10 ⁻⁶
Tabersonine	-6.83	9,85 x 10 ⁻⁶
Vallesiachotamine	-6.37	21,54 x 10 ⁻⁶
Venalstonine	-7.20	5,31 x 10 ⁻⁶
Vincadiformine	-6.97	7,84 x 10 ⁻⁶
Vinervine	-7.07	6,53 x 10 ⁻⁶

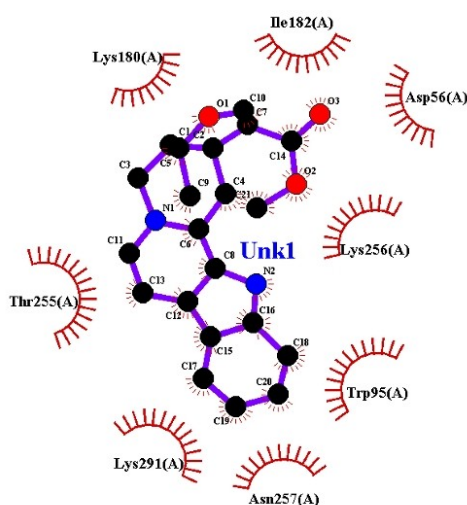
Fonte – Este trabalho

Conforme observado na tabela 1, os complexos proteína-ligante, Alstonine e Catharanthine foram as que apresentaram os ($\Delta G_{\text{ligante}}$) mais estáveis. Isto é, quanto menor o

valor da energia de Gibbs mais estável é a ligação macro e micromolécula. Desse modo, esses complexos, se tornam interessantes para uma melhor análise dentro do estudo, devido à diferença das demais por apresentarem ($\Delta G_{\text{ligante}}$) -7,86 e -7,37 respectivamente como valores de energia.

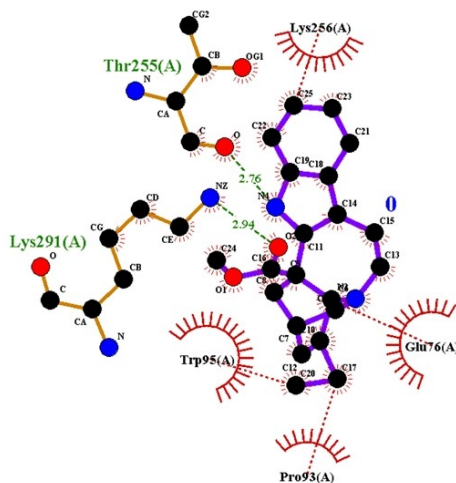
Em segundo momento, analisou-se os resíduos de aminoácidos do ligante que fizeram parte do complexo pós-docking, no caso, interagiram com o sítio ativo da proteína VP40. Assim, tanto interações hidrofóbicas e de hidrogênio estão presentes nos dois complexos e, essa análise foi feita utilizando o software *LigPlot+*, essas interações podem ser observadas nos diagramas das figuras 4 e 5.

Figura 1 – Diagrama Ligplot+ representando as interações hidrofóbicas (linhas tracejadas) presentes no complexo alstonine e VP40.



Fonte – Este trabalho

Figura 2 – Diagrama *Ligplot+* representando as interações hidrofóbicas (linhas tracejadas em vermelho) e ligações de hidrogênio (linhas tracejadas em verde) presentes no complexo catharanthine e VP40.





Fonte – Este trabalho

Tanto o primeiro diagrama quanto o segundo apresentam interações de hidrogênio e hidrofóbicas, como representado na tabela 2.

Tabela 2 – Interações presentes no dois complexos docados.

Complexo	Interações hidrofóbicas	Interações de hidrogênio
Alstonine	Asp56, Trp95, Lys180, Ile182, Tlu255, Asn257, Lys256, Lys291	-----
Catharanthine	Glu76, Pro93, Trp95, Lys256	Thr255, Lys291

Fonte – Este trabalho

De acordo com a tabela 2, a Alstonine apresentou um número de 8 interações hidrofóbicas (Asp56, Trp95, Lys180, Ile182, Tlu255, Asn257, Lys256, Lys291) enquanto a Catharanthine apresentou apenas 4 (Glu76, Pro93, Trp95, Lys256), com a presença a mais de 2 interações de hidrogênio (Thr255, Lys291).

As predições ADMET (Absorção, Distribuição, Metabolismo, Excreção e Toxicidade) foram analisados em função dos dois complexos mais estáveis, no caso a Alstonine e Catharanthine, as informações das predições dos dois ligantes estão presentes na tabela 3.

Tabela 3 – Parâmetros de Absorção, Distribuição, Metabolismo, Excreção e Toxicidade referente as moléculas Alstonine e Catharanthine.

Parâmetro	Alstonine	Catharanthine
Regra dos CInco	Qualificado	Qualificado

65^o CBOB CONGRESSO BRASILEIRO DE QUÍMICA "Química Inteligente e IA: A Nova Fórmula do Futuro no Nosso Presente" DE 10 A 13 DE NOVEMBRO DE 2026 NOVA PETRÓPOLIS - RS		
<i>Skin Permeability</i>	-3,198 (qualificado)	-2,932 (qualificado)
<i>Caco-2</i>	1,19 (baixa absorção)	1,114 (baixa absorção)
<i>CMC-Like</i>	Qualificado	Qualificado
<i>BBB</i>	0,257 (baixa absorção)	0,287 (baixa absorção)
<i>AMES Toxicity</i>	Não Mutagênico	Mutagênico
<i>hERG</i>	Favorável	Favorável

Fonte – Este trabalho

Seguindo a Regra dos Cinco (Rule of Five) proposta por Lipinski et. al. (1997) determinará que uma boa absorção só será efetiva se o número de aceptores de hidrogênio for ≤ 10 , a massa molécula for ≤ 500 g/mol, o número de doadores de ligação de hidrogênio for ≤ 5 , e $\text{LogP} \leq 5$. Ambas as moléculas se mostraram bastante promissoras nesse primeiro teste. Esses resultados demonstram uma boa afinidade dessas moléculas serem absorvidos oralmente.

O parâmetro Caco-2 é essencial para a produção de novos fármacos, devido analisar o grau de absorção intestinal via oral que se dará determinado fármaco. Nessa análise, para ser considerada uma baixa absorção o valor obtido deve ser inferior a 4; para uma absorção moderada a média deverá está entre 4 e 70, e uma alta absorção superior a 70. Logo, as moléculas apresentaram baixa absorção.

O *Comprehensive Medical Chemistry* (CMC-Like) é um parâmetro muito relevante para auxiliar no desenvolvimento de fármacos. O algoritmo ao fazer essa predição busca levar em consideração: lipofilidade (LogP) com valores entre -0,4 e 5,6; O número de átomos entre 20 e 70; A massa molecular entre 160 e 480; Relatividade molar entre 40 e 130 (Ghose et al., 1999). As moléculas foram aprovadas nesse teste, o que as tornam grandes candidatas a potenciais fármacos.

O parâmetro Barreira Sangue-Cérebro (BBB) busca analisar se determinado medicamento é capaz de ultrapassar a barreira hematoencefálica e alcançar o sistema nervoso



central. Para essa análise, é considerado valores superiores a 2 como uma permeabilidade mais alta de absorção, enquanto que valores entre 2 e 1 representam uma absorção moderada, logo valores < 1 apresentarão a menor absorção (Ma; Chen; Yang, 2005). Ambas as moléculas apresentaram valores similares e a baixo de 1, portanto apresentam uma baixa absorção pelo sistema nervoso central.

O *Skin Permeability*, é um parâmetro que avalia o quão suscetível será para um medicamento entra em contato com a pele e atravessar essa camada. Essa permeabilidade é analisada por meio do (LogKp), para isso, é necessário que o valor de (LogKp) seja inferior a 0. Com essa base, ambos os ligantes atenderam a esse requisito.

A predição de toxicidade, é um parâmetro importante, pois é responsável por apresentar dados de mutagenicidade e toxicidade da molécula, o que é de suma relevância quando se trabalha com fármacos. No entanto, ao realizar a predição do *AMES Toxicity*, relevou-se que a molécula Catharanthine é um mutagênico, ou seja, é capaz de causar mutações no DNA das células que pode levar a consequentemente ao desenvolvimento de células cancerígenas. No teste hERG (human ether-à-go-go-related) tanto a Alstonine quanto a Catharanthine apresentaram resultados favoráveis.

Conclusões

Em suma, por meio do estudo de Docking Molecular entre as moléculas derivadas da *Catharanthus roseus* e a proteína VP40, obteve-se a energias de estabilidade dos complexos formados. Assim, das 10 moléculas analisadas e ancoradas, as que possuíram o melhor efeito inibitório com base em suas energias livre de Gibbs ($\Delta g_{\text{ligante}}$) e energia de inibição (K_i) foram os complexos Alstonine e Catharanthine. Essas duas, apresentaram maior estabilidade de ligação dentre as demais o que pode resultar em um estudo mais aprofundado, posteriormente, in vitro.

Em suas análises ADMET, as duas moléculas apresentaram resultados favoráveis e se qualificaram em parâmetros como: CMC-Like; ensaio Caco-2; Skin Permeability; Rule of five e apresentou baixa absorção pelo sistema nervoso central no parâmetro (BBB). No entanto, nos testes de toxicidade, a molécula Catharanthine se revelou mutagênica, o que deve ser analisado com mais cuidado, caso seja realizado em estudos experimentais in vitro.



Desse modo, por mais que os dois complexos apresentem resultados de estabilidade molecular promissores, a molécula Catharanthine, em particular, deve ser analisada de acordo com o estudo a ser feito devido ao seu grau mutagênico detectado nos testes ADMET.

Referências

BISIMWA, Paterné et al. Ebola virus disease outbreak in the Democratic Republic of the Congo: A mini-review. *Annals of Medicine and Surgery*, p. 104213, 2022.

BRASIL, Ministério da Saúde. Disponível em: Acesso em: 23. dez. 2023.

CORDEIRO, Sandra. *Catharanthus roseus* (L.) G.Don, 2019/ Sandra Zorat Cordeiro – Rio de Janeiro (RJ): UNIRIO/PPGENF, 2019.

GODOY, B. R. B. Molecular Docking: o aliado na busca por medicamentos contra o SARS CoV-2. *Revista Blog do Profissão Biotec*, v. 8, 2021. Disponível em: Acesso: 23. dez. 2023.