



UFAL

INSTITUTO DE QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA
E BIOTECNOLOGIA

Investigação Computacional do Mecanismo Catalítico da nsP2 do Vírus Chikungunya (CHIKV)

EMANUELLY KARLA ARAÚJO PADILHA

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS

Campus A. C. Simões

Tabuleiro dos Martins

57072-970 - Maceió - AL

EMANUELLY KARLA ARAÚJO PADILHA

Investigação Computacional do Mecanismo Catalítico da nsP2 do Vírus Chikungunya (CHIKV)

Dissertação de mestrado apresentado ao programa de pós-graduação em Química e Biotecnologia (PPGQB) da Universidade Federal de Alagoas (UFAL), como requisito parcial para obtenção do grau de mestre em Química.

Orientador: Prof. Dr. Edeildo Ferreira da Silva Júnior

Coorientador: Prof. Dr. Julio Cosme Santos da Silva

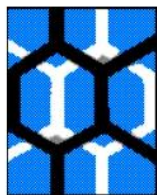
Maceió – AL
2025

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico

Bibliotecária: Girlaine da Silva Santos – CRB-4 – 1127

- P123i Padilha, Emanuely Karla Araújo.
Investigação Computacional do Mecanismo Catalítico da nsP2 do Vírus Chikungunya (CHIKV) / Emanuely Karla Araújo Padilha. – 2025.
60 f.: il.
- Orientador: Edeildo Ferreira da Silva Júnior.
Coorientador: Julio Cosme Santos da Silva.
- Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal de Alagoas, Instituto de Química e Biotecnologia. Programa de Pós-graduação em Química e Biotecnologia. Maceió, 2025.
- Bibliografia: f. 47- 56.
Anexos: f. 57- 60.
1. Cisteino protease. 2. Chikungunya. 3. Ativação enzimática. 4. Catálise. I. Título.

CDU: 66.097.6



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
INSTITUTO DE QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA E
BIOTECNOLOGIA



BR 104 Km14, Campus A. C. Simões
Cidade Universitária, Tabuleiro dos Martins
57072-970, Maceió-AL, Brasil
Fone: (82) 3214-1144
Email: ppgqb@iqb.ufal.br

FOLHA DE APROVAÇÃO

A Comissão Julgadora da Defesa de Dissertação de Mestrado de Emanuelly Karla Araújo Padilha intitulada: **“Investigação Computacional do Mecanismo Catalítico da nsP2 do Vírus Chikungunya (CHIKV)”**, realizada no Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas em 25 de fevereiro de 2025, às 9h, por meio de videoconferência, aprova o presente trabalho.

Maceió, 25 de fevereiro de 2025.

Comissão Examinadora:

Documento assinado digitalmente
gov.br ROMMEL BEZERRA VIANA
Data: 25/02/2025 15:07:25-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Dr. ROMMEL BEZERRA VIANA, UECE
Examinador (a) Externo (a) à Instituição

Documento assinado digitalmente
gov.br THIAGO MENDONCA DE AQUINO
Data: 25/02/2025 14:26:18-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Dr. THIAGO MENDONCA DE AQUINO, UFAL
Examinador (a) Interno (a)

Documento assinado digitalmente
gov.br JULIO COSME SANTOS DA SILVA
Data: 25/02/2025 19:25:19-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Dr. JULIO COSME SANTOS DA SILVA, UFAL
Coorientador

Documento assinado digitalmente
gov.br EDEILDO FERREIRA DA SILVA JUNIOR
Data: 25/02/2025 14:19:11-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Dr. EDEILDO FERREIRA DA SILVA JUNIOR, UFAL
Presidente

Dedico aos meus pais, José Karlisson e Shirleide, pelo amor, apoio e ensinamentos que me trouxeram até aqui, e aos meus irmãos, Karlisson e Emanuel, por serem minha inspiração e companheiros de jornada.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por me conceder saúde, força e sabedoria para enfrentar os desafios dessa jornada. Sem Sua graça e presença constante, essa conquista não seria possível.

Aos meus pais, pelo amor incondicional, apoio e ensinamentos que foram fundamentais para minha formação pessoal e profissional, e aos meus irmãos, por serem minha inspiração e por estarem sempre ao meu lado nessa caminhada.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Edeildo Ferreira da Silva Júnior, agradeço profundamente por me ter aceito em seu grupo de pesquisa e por todo o direcionamento e suporte dedicados a este projeto. Sua orientação foi fundamental para o meu crescimento profissional e acadêmico. Sou imensamente grata por compartilhar seus ensinamentos, por me proporcionar as oportunidades que enriqueceram minha formação e por sempre acreditar no meu potencial.

Ao meu coorientador, Julio Cosme Santos da Silva, pelo suporte, pelos ensinamentos e pela valiosa orientação ao longo do desenvolvimento deste trabalho.

Aos membros examinadores da banca, Prof. Dr. Thiago Mendonça Aquino e Prof. Dr. Rommel Bezerra Viana, por aceitarem o convite, disponibilizarem seu tempo e pelas enriquecedoras considerações a serem feitas ao trabalho.

Agradeço ao Grupo de Pesquisa em Química Biológica e Medicinal (GPQBioMOL) pelo ambiente de aprendizado, discussões enriquecedoras e parceria ao longo desta trajetória, e aos meus colegas de grupo pela parceria, apoio e troca de experiências que tornaram essa caminhada mais leve e enriquecedora.

Ao Laboratório NAPRMN, que foi minha casa durante a pesquisa de mestrado. Sou imensamente grata a todos os colegas que encontrei por lá, em especial a Edmilson, que desde o início esteve ao meu lado me ajudando na minha pesquisa.

À Midiane, minha parceira desde o início dessa jornada, por toda a amizade, carinho e apoio constante, que tornaram cada momento mais especial e significou muito para mim ao longo de todo esse caminho.

À minha madrinha, Viviane, por todo o suporte e incentivo que me deram forças no início do mestrado.

Aos meus amigos e familiares, que sempre me apoiaram e fizeram parte dessa conquista, meu mais sincero agradecimento.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio financeiro por meio da bolsa de estudos, que foi essencial para a realização desta pesquisa.

O correr da vida embrulha tudo; a vida é assim:
esquenta e esfria, aperta e daí afrouxa, sossega e
depois desinquieta. O que ela quer da gente é
coragem.

(Guimarães Rosa)

RESUMO

A proteína nsP2 do vírus Chikungunya (CHIKV) é uma cisteína protease essencial para a formação do complexo de replicação viral. Dessa forma, compreender seu mecanismo molecular é fundamental para o desenvolvimento de novos inibidores. Nesta dissertação, investigamos exclusivamente o mecanismo de ativação enzimática da nsP2 por meio de simulações de dinâmica molecular (DM), utilizando uma abordagem de cluster, bem como por meio de cálculos de mecânica quântica (MQ) para estudar a reação enzimática no sítio ativo da enzima. Especificamente, analisamos a ativação da díade catalítica Cys⁴⁷⁸-His⁵⁴⁸ e verificamos a influência da presença de uma molécula de água nesse processo. Quando uma molécula de água está presente, a distância entre Cys⁴⁷⁸ e His⁵⁴⁸ no estado de transição é de 1,96 Å (SH...OH₂) e 1,28 Å (N...H₂O). Além disso, os cálculos de energia de ativação indicam que a presença de água reduz a barreira energética em aproximadamente 7 kcal/mol, favorecendo o mecanismo de ativação da enzima. Com base nesses resultados, propomos um modelo para um possível caminho reacional, incluindo o estado de transição para a transferência de próton na formação do par iônico Cys(S⁻)/His(NH⁺). A compreensão desse mecanismo em nível molecular permite identificar pontos críticos no funcionamento da nsP2 que podem ser explorados no planejamento de inibidores específicos. Assim, nossos achados fornecem uma base sólida para o desenvolvimento racional de compostos com potencial aplicação no tratamento da febre Chikungunya.

Palavras-chave: Cisteína protease; nsP2; Chikungunya; Catálise; Ativação enzimática.

ABSTRACT

The nsP2 protein of the Chikungunya virus (CHIKV) is a cysteine protease essential for the formation of the viral replication complex. Therefore, understanding its molecular mechanism is crucial for the development of novel inhibitors. In this dissertation, we exclusively investigate the enzymatic activation mechanism of nsP2 through molecular dynamics (MD) simulations using a cluster approach, as well as quantum mechanics (QM) calculations to study the enzymatic reaction within the active site. Specifically, we analyze the activation of the catalytic dyad Cys⁴⁷⁸-His⁵⁴⁸ and assess the influence of a water molecule on this process. When a water molecule is present, the distance between Cys⁴⁷⁸ and His⁵⁴⁸ in the transition state is 1.96 Å (SH $\cdots$ OH₂) and 1.28 Å (N $\cdots$ H₂O). Additionally, activation energy calculations indicate that the presence of water lowers the energy barrier by approximately 7 kcal/mol, facilitating the enzyme activation mechanism. Based on these findings, we propose a model for a possible reaction pathway, including the transition state for proton transfer in the formation of the ion pair Cys(S⁻)/His(NH⁺). Understanding this mechanism at the molecular level allows for the identification of critical points in nsP2 function that can be explored in the design of specific inhibitors. Thus, our findings provide a solid foundation for the rational development of compounds with potential applications in the treatment of Chikungunya fever.

Keywords: Cysteine protease; nsP2; Chikungunya; Catalysis; Enzyme activation.

Sumário

1	INTRODUÇÃO	14
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	15
2.1	CONTEXTO HISTÓRICO	15
2.2	CICLO DE VIDA DO VÍRUS CHIKUNGUNYA	16
2.3	CISTEÍNO PROTEASE (CP)	18
2.4	MECANISMO CATALÍTICO DAS CISTEINAS PROTEASES	19
2.5	PROTEÍNA NÃO ESTRUTURAL 2 (NSP2) DO CHIKV	21
3	MODELAGEM COMPUTACIONAL DE REAÇÕES ENZIMÁTICAS	23
3.1	DINÂMICA MOLECULAR (DM)	23
3.2	MÉTODOS QUÂNTICOS	24
3.3	ABORDAGEM DE CLUSTER	26
4	OBJETIVOS	31
4.1	OBJETIVO GERAL	31
4.1.1	<i>Objetivos específicos</i>	31
5	METODOLOGIA	32
5.1	PROCEDIMENTO COMPUTACIONAL.....	32
5.2	PROTEÍNA NSP2 DO CHIKV (PDB: 4ZTB).....	32
5.3	SIMULAÇÃO DE DINÂMICA MOLECULAR	32
5.4	PREPARAÇÃO DA ABORDAGEM DE CLUSTER.....	33
5.5	CÁLCULOS DFT	34
6	RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
6.1	SIMULAÇÃO DE DINÂMICA MOLECULAR.....	36
6.2	MECANISMO DE REAÇÃO: CÁLCULOS DFT DE ABORDAGEM DE CLUSTER	38
6.3	EFEITOS DO AMBIENTE ELETROSTÁTICO	41
7	CONCLUSÕES.....	46
8	REFERÊNCIAS	47
9	ANEXO A – ARTIGOS PUBLICADOS E/OU ACEITOS	57

1 INTRODUÇÃO

No que diz respeito à implicação particular das cisteíno proteases (CPs) no desenvolvimento de novos medicamentos, pode-se mencionar, por exemplo, que a nsP2 representa um alvo terapêutico potencial contra o vírus Chikungunya (CHIKV) (TOMAR; AGGARWAL, 2017). A enzima multifuncional nsP2, em seu domínio C-terminal, exibe funções de protease ao clivar a poliproteína viral, permitindo a proliferação do vírus. Consequentemente, há a necessidade de desenvolver terapias eficientes contra o CHIKV, mais especificamente contra a nsP2, uma vez que não há fármacos antivirais disponíveis no mercado. Inibidores irreversíveis de proteases, que contêm um grupo funcional eletrofílico, podem se ligar covalentemente à enzima através de um resíduo cisteína, via ataque nucleofílico da protease. Atualmente, muitos aspectos dos mecanismos de inibição e dos mecanismos catalíticos da nsP2 são desconhecidos e/ou ainda estão em debate. Portanto, é crucial entender esses mecanismos enzimáticos a nível molecular para projetar novos inibidores que permitam um tratamento eficaz contra o CHIKV.

A complexidade das enzimas e suas reações limita a eficácia dos experimentos tradicionais no estudo da atividade enzimática. A química computacional emerge como uma ferramenta importante para investigar a atividade de enzimas, permitindo a compreensão dos seus mecanismos fundamentais por meio do estudo de estados de transição/barreiras de ativação, estruturas que são impossíveis de analisar com técnicas experimentais devido a sua brevidade. As melhorias alcançadas nas últimas décadas são aplicadas em diversas áreas, como medicina, biologia, química e física, destacando a importância da química computacional e teórica.

Neste contexto, a reação de ativação catalítica da nsP2 do CHIKV foi investigada por meio de simulações de dinâmica molecular (DM) em uma abordagem de cluster, bem como mecânica quântica (MQ). A investigação focou na formação do par iônico (Cys/His), como ponto de partida para a ativação desta enzima, explorando a possibilidade desse mecanismo ser catalisado por água, um aspecto que ainda não foi relatado na literatura. Diferentemente dos estudos anteriores, que consideram o par iônico já formado, esta pesquisa avaliou as possibilidades de formação desse par iônico.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Contexto Histórico

O vírus Chikungunya (CHIKV) é um arbovírus emergente pertence ao gênero *Alphavirus*, da família *Togaviridae* (ABDELNABI *et al.*, 2017; BOURJOT *et al.*, 2012; ELEFTHERIADOU *et al.*, 2017; FARRELL *et al.*, 2018; MORRISON e ANDER, 2021). Dentre as várias infecções arbovirais existentes, o CHIKV tem o potencial de reemergir, sendo considerado também uma doença tropical negligenciada (DTN), de acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS) (SILVA-JÚNIOR e ZHAN, 2023; SAGAR *et al.*, 2024; SCOTT *et al.*, 2022).

Na última década, o CHIKV tem sido responsável por grandes surtos de uma doença artrítica debilitante em humanos (SILVA-JÚNIOR *et al.*, 2017; KUMAR, Rajesh *et al.*, 2021; ZAID *et al.*, 2021). A febre provocada pelo CHIKV (chamada de febre Chikungunya – CHIKF) foi identificada pela primeira vez em 1952, após um surto no Planalto Makonde, localizado na fronteira entre Tanzânia e Moçambique (GOBBI *et al.*, 2015; SUDEEP e PARASHAR, 2008; ZOA-ASSOUMOU *et al.*, 2020). Durante esse surto, uma alta proporção de pessoas de todas as idades foi afetada por essa doença, caracterizada inicialmente por dores articulares incapacitantes, febre alta e erupção cutânea.

Como os anciões das tribos Makonde não tinham memória de epidemias anteriores com esses sintomas, sugeriram que estavam diante de uma nova doença (RASHAD *et al.*, 2014). Essa nova doença foi nomeada com o termo “*Chikungunya*” que significa “*aquele que se curva*”, fazendo referência às pessoas acometidas com a doença, que possuíam uma postura encurvada devido à poliartralgia característica (RASHAD *et al.*, 2014). Após esse período, apenas pequenos surtos ocorreram ocasionalmente na África (COHEN *et al.*, 1969).

No entanto, grandes epidemias foram relatadas nas décadas de 1960 e 1970 na Índia e no Sudeste Asiático (COHEN *et al.*, 1969). Após esse período, apenas aparições esporádicas foram observadas nos 30 anos seguintes, sem grandes recorrências até um grande surto no Quênia em 2004 (RAMPHAL *et al.*, 2024). Esse evento desencadeou uma epidemia que se alastrou por várias ilhas do Oceano Índico, pela Índia e por partes do Sudeste Asiático, sendo posteriormente detectada em cerca de 18 países da Ásia, Europa e América do Norte (BETTIS *et al.*, 2022; DE LA ROQUE *et al.*, 2024).

2.2 Ciclo de vida do vírus Chikungunya

A superfície do CHIKV possui 80 projeções compostas por três proteínas, formadas por heterodímeros de glicoproteínas de envelope (E1 e E2) na bicamada lipídica (RASHAD *et al.*, 2014). O ciclo de vida do CHIKV é semelhante ao ciclo de vida de outros *Alphavirus*, ou seja, inicia-se com a entrada nas células susceptíveis por meio de endocitose dependente do pH. Esse processo ocorre em pequenas vesículas especializadas, revestidas por proteínas que ajudam no transporte, através de uma interação mediada por receptores (BERNARD *et al.*, 2010; SINGH e UNNI, 2011). Embora seu mecanismo exato não tenha sido totalmente compreendido, foi demonstrado que o CHIKV se replica em diversos tipos celulares, como células epiteliais, endoteliais e fibroblastos, bem como, macrófagos derivados de monócitos (SOURISSEAU *et al.*, 2007). Wintachai *et al.* (2012) identificou a proibitina (PHB) como uma proteína de ligação ao CHIKV expressa em células da microglia.

A PHB é uma proteína ubíqua e evolutivamente conservada, composta por duas proteínas altamente homólogas, mas com diferentes pesos moleculares (VAN DUIJL-RICHTER *et al.*, 2015; WINTACHAI *et al.*, 2012). A PHB1 tem uma massa de aproximadamente 30 kDa, enquanto, a PHB2 possui cerca de 37 kDa. As duas proteínas oligomerizam-se, sendo a hetero-oligomerização essencial para a estabilidade delas (BERGER; YAFFE, 1998).

A PHB tem sido detectada em diversos compartimentos celulares, como mitocôndrias, citoplasma e núcleo, além de ser expressa na superfície celular (KOLONIN *et al.*, 2004). A PHB1 está envolvida no processo de internalização, seja isoladamente ou como parte de um complexo, sugerindo que a interação vírus-PHB pode ser mediada pela PHB específica que se liga ao vírus (RASHAD *et al.*, 2014). A redução experimental da PHB1 significativamente diminuiu o nível de infecção em diferentes linhagens celulares. Porém, acredita-se que este mecanismo representa uma das vias pelas quais o CHIKV pode infectar células susceptíveis (BERGER e YAFFE, 1998; RASHAD *et al.*, 2014).

Após entrar na célula, o ambiente ácido do endossomo provoca mudanças conformacionais nas proteínas do envelope viral (complexo E1-E2), resultando na dissociação dos heterodímeros E2-E1 e na formação de homotrímeros de E1 (DE CALUWÉ *et al.*, 2021; LIU *et al.*, 2024). A E1 é um trímero que se insere na membrana alvo com o peptídeo de fusão hidrofóbico e se reorganiza para adquirir uma estrutura em forma de grampo.

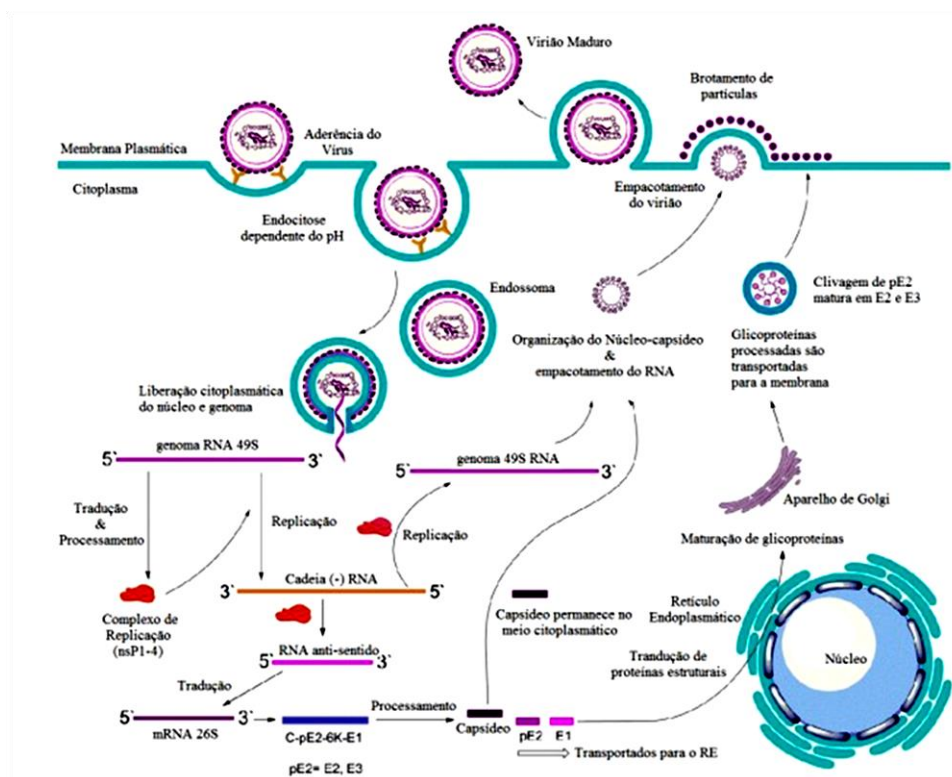
A exposição do peptídeo de fusão E1 facilita a fusão da membrana celular hospedeira com a viral, liberando o nucleocapsídeo no citoplasma. Esse processo depende

de pH baixo e colesterol, que também são necessários para a brotação de partículas virais durante a infecção, as quais são chamadas de vírions (CHATTERJEE *et al.*, 2000; DE CALUWÉ *et al.*, 2021; KIELIAN e REY, 2006; LEUNG *et al.*, 2011; LIU *et al.*, 2024; MARSH e HELENIUS, 2006).

Duas precursoras de proteínas não estruturais são traduzidas a partir do mRNA viral e, em seguida, são clivadas para gerar nsP1-nsP4 (RASHAD *et al.*, 2014; SOLIGNAT *et al.*, 2009). Durante a tradução, a poliproteína P1234 se une à nsP4 livre e a algumas proteínas celulares, formando o complexo de replicação, responsável por sintetizar um intermediário completo de RNA senso-negativo necessário para a replicação (ABDELNABI *et al.*, 2015; GOULD *et al.*, 2010; SOLIGNAT *et al.*, 2009). Com o aumento da concentração de P1234, esta é clivada em nsP1, nsP2, nsP3 e nsP4, as quais se associam às proteínas hospedeiras para formar a replicase de cadeia positiva. Isso resulta na produção de RNAs subgenômicos de cadeia positiva (26S) e RNAs genômicos (49S) (ABDULLAH *et al.*, 2021; AHOLA *et al.*, 2021; GOULD *et al.*, 2010; SHIRAKO e STRAUSS, 1994).

Os promotores presentes na cadeia negativa iniciam a transcrição do RNA subgenômico de cadeia positiva 26S, que contém os genes precursores das proteínas estruturais. Essas proteínas são então clivadas por uma serino protease para formar o capsídeo (C), que permanece no citoplasma (Figura 1), pE2, 6K e E1 (KHAN *et al.*, 2002; SHIRAKO e STRAUSS, 1994). A proteína C pode estar envolvida nessa atividade autoproteolítica devido às suas sequências conservadas, características compartilhadas com outros *Alphavirus* (KHAN *et al.*, 2002).

Figura 1 – Ciclo biológico do vírus Chikungunya



Fonte: Rashad et al., 2014 (adaptação)

As proteínas pE2 e E1 são sintetizadas no retículo endoplasmático e processadas no aparelho de Golgi (TANG, 2012) (Figura 1). Em seguida, são transportadas para a membrana plasmática, onde pE2 é clivada pela atividade de uma protease semelhante à furina na célula hospedeira, resultando em E2 e E3 (CHING *et al.*, 2017; RASHAD e KELLER, 2013). A montagem das partículas virais começa no citoplasma da célula, onde se inicia a formação do núcleocapsídeo com 120 dímeros da proteína C (MENDES; KUHN, 2018). As partículas montadas brotam na membrana celular como esferas com diâmetro de 65 a 70 nm, compostas por moléculas de RNA genômico e proteínas do capsídeo, envoltas por uma membrana lipídica derivada do hospedeiro (PERERA *et al.*, 2001).

2.3 Cisteíno Protease (CP)

As proteases representam uma importante classe de proteínas envolvidas na hidrólise de peptídeos e outras proteínas (nesses casos, sendo também conhecidas como proteinases) (FARIAS *et al.*, 2024; MATIĆ *et al.*, 2023; YAO *et al.*, 2024). Considerando seu mecanismo catalítico, estas podem ser separadas em diferentes grupos: serino protease, aspartato protease, cisteíno protease (CP), glutamato protease, treonino protease ou até

mesmo metaloprotease.

A família papaína (família C1) é a classe de cisteíno protease mais conhecida, que pertence ao clã CA. Historicamente, a papaína foi a primeira cisteína protease purificada e caracterizada a partir do mamão *Carica papaya*, sendo também a primeira cisteína protease a ser resolvida (SAJID; MCKERROW, 2002). As CPs da família da papaína estão envolvidas em diversas patologias, o que as torna alvos atraentes para o desenvolvimento de novos medicamentos. Por fim, como o próprio nome indica, as CPs são caracterizadas principalmente pela presença de um resíduo de cisteína (Cys) catalítico no sítio ativo (GOLUBTSOV *et al.*, 2006; NEILL, 1990).

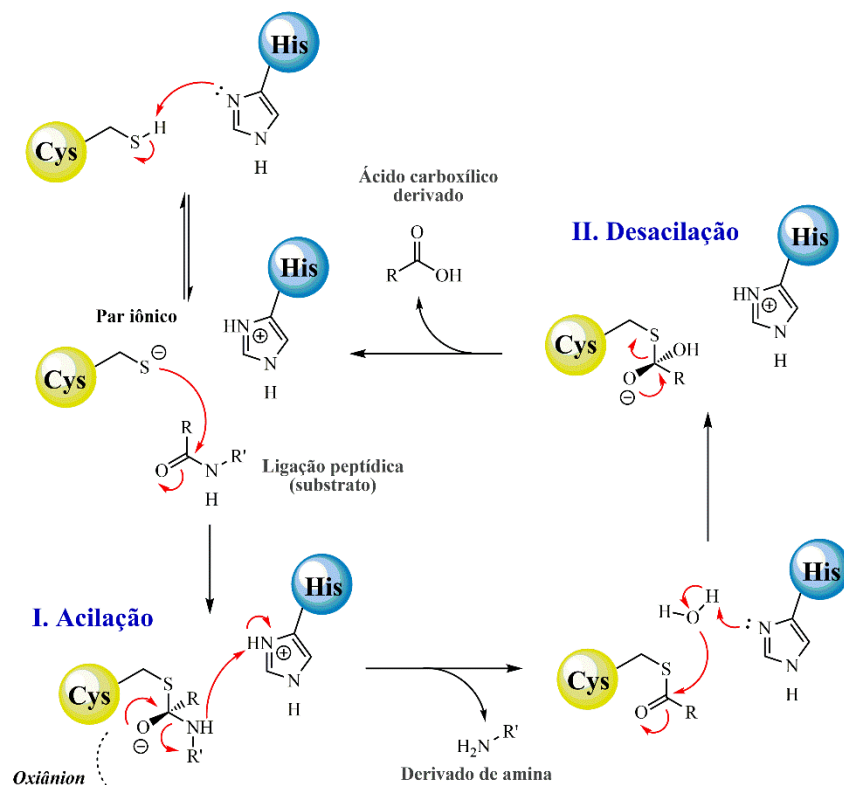
2.4 Mecanismo Catalítico das Cisteínas Proteases

O mecanismo catalítico das CPs depende de dois resíduos localizados no local ativo, a cisteína (Cys) e um resíduo básico adjacente, normalmente a histidina (His) (ARGÜELLO-GARCÍA; CARRERO; ORTEGA-PIERRES, 2023). Tem sido admitido que o grupo imidazol da His polariza o grupo tiol da Cys, por meio da desprotonação do grupo tiol, SH (via mecanismo ácido-base de Brønsted-Lowry), resultando assim em um par iônico, $\text{Cys}(\text{S}^-)/\text{His}(\text{NH}^+)$ (KEILLOR; BROWN, 1992; SMITH; WILSON, 2022).

A existência do par iônico nas CPs foi comprovada experimentalmente por diferentes estudos (CREIGHTON *et al.*, 1980; LEWIS, S. D. e SHAFER, 1974; LEWIS, Sidney D. *et al.*, 1981), elucidado por meio da aplicação de ferramentas computacionais (ARAFET *et al.*, 2014; BURTON *et al.*, 1998; GRAZIOSO *et al.*, 2012; OANCA *et al.*, 2020). Em geral, é aceito que o mecanismo catalítico das CPs consiste em dois estágios, sendo (I) acilação e (II) desacilação. O estágio de acilação consiste basicamente no ataque nucleofílico do ânion tiolato da Cys ao carbono carbonílico da ligação peptídica do substrato, produzindo um intermediário tetraédrico aniônico, que é estabilizado no por um resíduo básico adjacente no buraco oxianiônico.

Em seguida, a desacilação ocorre por meio de uma reação catalisada por uma base geral, nesse caso, a His, em que o nitrogênio imidazólico ativa uma molécula de água, que ataca o carbono carbonílico da ligação peptídica para clivar o produto e a regenerar o par iônico inicial, $\text{Cys}(\text{S}^-)/\text{His}(\text{NH}^+)$ (Figure 2).

Figura 2 – Mecanismo catalítico das cisteínas proteases dos *Alphavirus*



Fonte: Autora, 2025.

Neste contexto, vários experimentos e estudos computacionais foram realizados para explicar a maneira pela qual as CPs catalisam a quebra de ligações peptídicas de seus substratos (ARAFET *et al.*, 2014, 2015).

Na etapa de acilação ocorre a formação do intermediário tetraédrico aniônico, em que esta etapa ocorre similarmente ao mecanismo de serino proteases (DRENTH *et al.*, 1976), em que o ânion tiolato ataca o carbono carbonílico da ligação peptídica do substrato para produzir um intermediário tio-hemicetal. Este intermediário seria estabilizado por uma interação de ligação de hidrogênio com o grupo NH da Cys e com o grupo NH₂ da Glu adjacente, que cria um buraco oxianiônico semelhante ao proposto nas serino proteases. Então, um próton é transferido da His para o nitrogênio da ligação peptídica, concomitantemente com a clivagem da ligação peptídica C-N, formando o intermediário tetraédrico. No entanto, a estabilidade do intermediário tio-hemicetal tem sido questionada por alguns autores (HOWARD e KOLLMAN, 1988; WEI *et al.*, 2013). A desacilação ocorre quando uma molécula de água ataca o complexo acila-enzima no carbono carbonílico para clivar o produto e regenerar o par de íons.

Muitos grupos de pesquisa têm reportado o uso de mecânica quântica (MQ) na investigação de mecanismos enzimáticos das CPs, bem como, a atuação de inibidores que

possam impedir a replicação viral e a proliferação das doenças causadas por CPs. Em 2014, Arafet *et al.* realizaram estudos de MQ/MM para investigar o mecanismo de inibição da CP expressa durante a fase eritrocítica do ciclo de vida do parasita causador da malária *Falciparum*-2, pelo Epoxisuccinato 64 (E64). Eles utilizaram simulações computacionais para obter um cenário completo dos possíveis caminhos de reação de energia livre. Uma análise detalhada do mecanismo de reação foi realizada para entender a inibição da *Falciparum*-2 pelo E64.

Os resultados sugerem que a reação de ataque irreversível da Cys⁴² ao E64 pode ocorrer em ambos os átomos de carbono do anel epóxido, com barreiras de energia do estado de transição semelhantes, sendo 13,0 kcal/mol para o carbono C2 e 13,6 kcal/mol para o carbono C3 do anel epóxido. Além disso, os autores identificaram que os resíduos Gln³⁶, Trp⁴³, Asn⁸¹, Asp¹⁷⁰, Gln¹⁷¹ e His¹⁷⁴ podem ancorar o inibidor em uma orientação adequada para a reação ocorrer (ARAFET *et al.*, 2014).

Em 2015, o mesmo grupo realizou simulações de MQ/MM para investigar o mecanismo de inibição de cruzaina por peptidilalometilcetonas (ARAFET *et al.*, 2015). Eles traçaram caminhos de reação de energia livre em superfícies de energia livre. A análise dos mecanismos de reação revelou que o ataque nucleofílico do tiolato do sítio ativo, Cys²⁵, em um átomo de carbono do inibidor e a clivagem da ligação halogênio-carbono ocorrem em um único passo. Além disso, eles compararam a favorabilidade cinética de dois inibidores, destacando que um derivado clorado apresentou melhores resultados do que um fluorado.

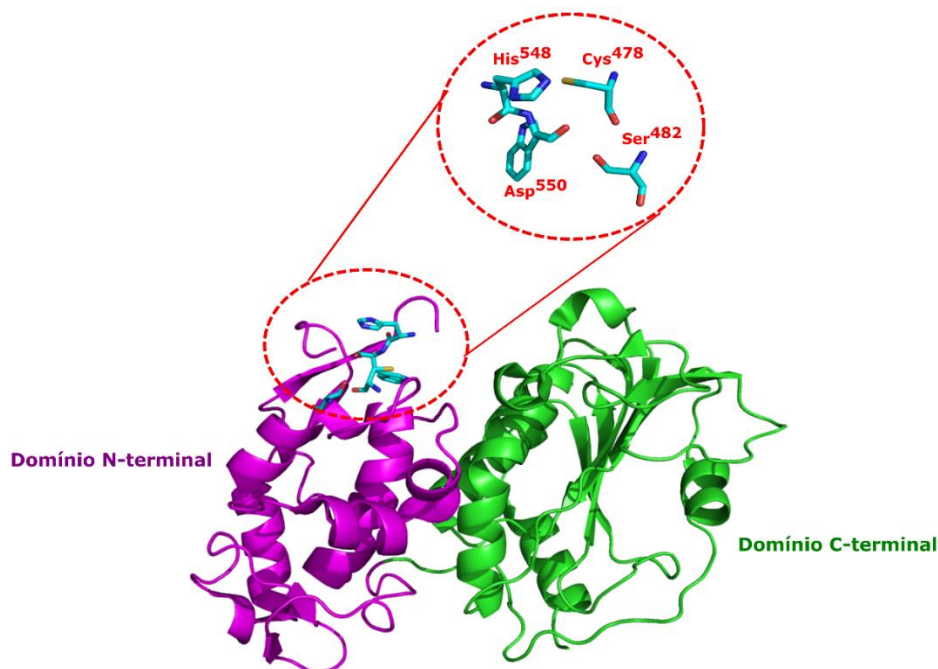
Ainda em 2020, Oanca *et al.* exploraram o perfil de energia para a reação de acilação e parte da reação de desacilação de três enzimas diferentes, cruzaina, papaína e a papaína mutante (Q19A), utilizando o substrato benzoiloxycarbonil-fenilalanil-arginina-4-metilcumarila-7-amida (CBZ-FR-AMC) (OANCA *et al.*, 2020). Os resultados indicaram concordância entre os resultados calculados e observados, sugerindo que elucidaram o mecanismo correto da reação. Além disso, os autores destacaram que o mínimo do perfil de reação, entre as etapas de acilação e desacilação, pode fornecer um excelente estado para a ligação de inibidores covalente.

2.5 Proteína Não Estrutural 2 (nsP2) do CHIKV

No CHIKV, o processamento da poliproteína P1234 em proteínas separadas é realizado pela atividade da nsP2, que é uma protease viral (DING e SCHLESINGER, 1989; SAISAWANG *et al.*, 2017). A nsP2 também possui outras funções enzimáticas, tais como helicase de RNA, nucleosídeo trifosfatase (NTPase) e atividades de trifosfatase 5'-
21

dependentes de RNA, que estão localizadas no domínio *N*-terminal da proteína, enquanto o domínio protease, responsável pela clivagem da P1234 está situado na região *C*-terminal, ver figura 3 (DA SILVA-JÚNIOR *et al.*, 2017; SAISAWANG *et al.*, 2017).

Figura 3 – Domínios C- e N-terminal da nsP2 e a formação do par iônico



Fonte: Autora, 2025.

A atividade proteolítica da nsP2 do CHIKV foi demonstrada anteriormente, em estudos experimentais que investigaram substratos peptídicos marcados com 7-amino-4-metilcumarina (MCA), comandado por Pastorino *et al.* (2008). Os substratos utilizados incluíram o tripeptídeo Boc-AGG-MCA. As condições ótimas para a atividade enzimática foram determinadas, com o pH ideal de 9,5 e um atividade estável acima de 80% entre pH 8 e 10. A influência da força iônica foi examinada, demonstrando que concentrações de NaCl entre 10 e 50 mM otimizaram a atividade proteolítica, enquanto concentrações mais elevadas resultaram em uma diminuição significativa da atividade. A nsP2 mostrou resistência a inibidores de outras classes de proteases, confirmando sua classificação como uma protease de cisteína (PASTORINO *et al.*, 2008).

A importância da nsP2 no desenvolvimento de fármacos para doenças virais é observada na quantidade de estudos que tentam entender melhor a sua funcionalidade.

3 Modelagem computacional de reações enzimáticas

3.1 Dinâmica Molecular (DM)

Na mecânica molecular (MM), os átomos que compõem uma molécula são modelados como esferas rígidas contendo uma carga parcial. As ligações químicas são frequentemente descritas por potenciais harmônicos, semelhantes aos usados para descrever a dinâmica de sistemas do tipo massa-mola (DIAS, 2012; SILVA, 2013).

Embora os métodos MM não possam ser utilizados para modelar reações químicas diretamente, desempenham um papel crucial nas simulações de enzimas. Em grande parte, estes métodos são utilizados em simulações de DM (BHATT *et al.*, 2021; KUZMANIC *et al.*, 2020) ou combinado com métodos de mecânica quântica no estudo de reações enzimáticas (KÄSTNER *et al.*, 2006; RIBEIRO *et al.*, 2015).

Os métodos MM possibilitam simulações de longa duração da dinâmica de proteínas, abrangendo desde nanossegundos até microssegundos (BHATI *et al.*, 2023). Essa capacidade deve-se aos funcionais simples que costumam ser empregadas nas funções de energia MM, também conhecidas como campos de força (VAN DER KAMP *et al.*, 2008).

As interações de van der Waals são modeladas por meio de uma função de potencial do tipo Lennard-Jones (KAUKONEN *et al.*, 2012). Nos campos de força MM, as interações eletrostáticas são normalmente descritas de maneira simplificada, utilizando cargas pontuais fixas localizadas nos átomos (RINIKER, 2018). Essas cargas atômicas permanecem inalteradas diante de mudanças no ambiente molecular ou na conformação, o que implica que variações na polarização eletrônica não são consideradas (LONSDALE *et al.*, 2012).

As funções padrão da MM não são capazes de modelar a quebra e formação de ligações, nem a reorganização eletrônica envolvida em reações químicas (CHUNG *et al.*, 2015). Por exemplo, o termo harmônico utilizado para representar as ligações não permite sua quebra. Além disso, os parâmetros dos campos de força da MM são desenvolvidos com base nas propriedades de moléculas estáveis, o que os torna geralmente inadequados para descrever intermediários instáveis e estados de transição (LONSDALE *et al.*, 2012).

A junção dos métodos de MM com as equações de movimento da DM oferece uma abordagem eficaz para descrever propriedades de fenômenos dependentes do tempo (MAO *et al.*, 2023). A resolução das equações de movimento permite a análise de um grande número de movimentos internos e mudanças conformacionais em processos enzimáticos em solução (HOLLINGSWORTH e DROR, 2018). Para um sistema com n partículas, uma

simulação de DM consiste essencialmente na resolução da equação do movimento de Newton, como mostrado na equação (1):

$$\vec{F}_n = m_n \cdot \vec{a}_n \quad (1)$$

Onde $\vec{F}_n$ é a força que induz uma aceleração $\vec{a}_n$ em um átomo com massa m_n . Esta força pode ser calculada derivando a energia potencial U em relação às coordenadas r_n dos átomos (SANT'ANNA, 2009) (Equação 2).

$$m_i \frac{d^2 r_i}{dt^2} = F_i \quad (2)$$

Onde m_i é a massa da partícula i , r_i é a posição da partícula i , e F_i é a força atuando sobre a partícula i . Uma vez definido o campo de força, é possível calcular as forças exercidas sobre os átomos do sistema através da primeira derivada da energia potencial. Na MM, esta energia potencial é determinada por um campo de força específico como do tipo mostrado na equação 3.

$$U(\{r_i\}) = \sum_{\text{ligações}} k_b (r - r_0)^2 + \sum_{\text{ângulos}} k_\theta (\theta - \theta_0)^2 + \sum_{\text{diétricos}} \frac{V_n}{2} [1 + \cos(n\phi - \gamma)] + \sum_{i < j} \frac{A_{ij}}{r_{ij}^{12}} - \frac{B_{ij}}{r_{ij}^6} + \frac{q_i q_j}{4\pi\epsilon_0 r_{ij}} \quad (3)$$

Onde o primeiro termo representa a energia de ligação com constante de força k_b e distância de equilíbrio r_0 . O segundo termo representa a energia angular com constante de força k_θ e ângulo de equilíbrio θ_0 . O terceiro termo representa a energia de torção com amplitude V_n , multiplicidade n , e fase γ . O quarto termo representa as interações não-ligadas (van der Waals e eletrostáticas) com os parâmetros A_{ij} e B_{ij} para o potencial de Lennard-Jones, e q_i e q_j são as cargas dos átomos i e j .

3.2 Métodos Quânticos

Para modelar uma reação química, é necessário utilizar um método que consiga quantificar o processo de quebra e formação de ligações químicas. Como apresentado acima, os métodos MM não são capazes de representar esse fenômeno. Os métodos de MQ, por sua vez, são capazes de modelar explicitamente a distribuição de elétrons nas moléculas (ALBUQUERQUE *et al.*, 2020). É utilizado em grande parte, no estudo de estruturas moleculares, estruturas eletrônicas e reações de moléculas pequenas.

A equação de Schrödinger não pode ser resolvida exatamente para sistemas moleculares com mais de um elétron, exigindo assim aproximações para sistemas de

muitos corpos (SHOLL, 2009). Dependendo das aproximações utilizadas, os diferentes métodos de MQ podem ser classificados em três tipos: *ab initio*, Teoria do Funcional da Densidade (DFT) e semi-empíricos (BARAQUE DE FREITAS RODRIGUES *et al.*, 2023; CHERMETTE, 1998; SHOLL, 2009). Os métodos MQ *ab initio* aplicam a teoria de Hartree-Fock (HF), onde se assume que a distribuição espacial de cada elétron é independente do movimento instantâneo dos outros elétrons (LONSDALE *et al.*, 2012; SIRIRAK *et al.*, 2020). No entanto, esta aproximação tem uma limitação, pois ignora a correlação eletrônica explícita entre os elétrons.

A negligência deste efeito no cálculo da energia total pode causar grandes erros em cálculos HF para reações químicas (LONSDALE *et al.*, 2012). Com um custo computacional substancialmente menor, os métodos DFT, podem atingir uma precisão comparável à dos métodos *ab initio*. Para a DFT, a energia do estado fundamental de uma molécula pode ser determinada com base na distribuição da densidade eletrônica (CHERMETTE, 1998).

Diferente da função de onda *ab initio*, uma função de $3N$ variáveis, onde N é o número de elétrons, a densidade é uma função de apenas três variáveis, o que a torna mais simples (SHOLL, 2009). A grande dificuldade, é que a forma exata do funcional que relaciona a densidade à energia ainda não é conhecida (LONSDALE *et al.*, 2012).

Nas últimas décadas, foram desenvolvidos diversos funcionais aproximados, utilizando características limitadas conhecidas do funcional exato. Um funcional que se destaca é o B3LYP, ele é considerado um funcional híbrido, ou seja, possui uma porção da troca exata HF combinada com contribuição de outros funcionais, como o funcional de troca de Becke88 e o funcional de correlação de Lee-Yang-Parr. Os métodos semi-empíricos por sua vez, apresentam uma demanda computacional menor do que as relacionadas com os métodos *ab initio* tradicionais, citados anteriormente. Portanto, podem ser aplicados a sistemas maiores do que se consegue com uso dos métodos DFT, HF ou demais métodos correlacionados (por exemplo, MP2, Coupled Cluster, etc).

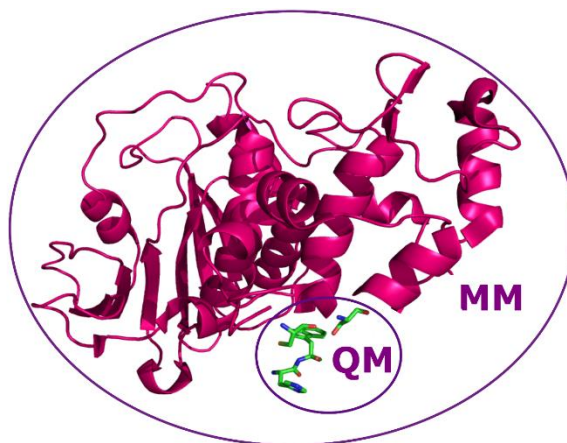
Uma outra abordagem, frequentemente usada no estudo de reações enzimáticas, utiliza uma metodologia híbrida, MQ/MM. Nos métodos MQ/MM, a região de principal interesse do sistema, o sítio ativo, por exemplo, onde ocorre quebra e formação de ligações químicas, é tratada com um método MQ, pela precisão do cálculo, enquanto o restante da enzima é modelado utilizando um campo de força MM (Figura 4).

Yagi *et al.* (2021) investigaram reações enzimáticas usando cálculos MQ/MM, identificando rotas de energia mínima e perfis de energia livre para a triosefosfato isomerase. Assim, encontraram uma barreira energética de 13 kcal/mol, validada

experimentalmente, e demonstraram um desempenho significativo nas simulações (YAGI *et al.*, 2021).

Ao utilizar MQ/MM para estudar inibidores covalentes de proteases cisteínicas, Costa *et al.* (2020) encontraram uma boa correlação entre a energia livre de reação calculada e os dados experimentais ($R^2 = 0,80$). A análise mostrou que a maioria das reações era exergônica, com exceção de um composto com energia livre de reação ligeiramente positiva (0,32 kcal/mol), bem como, que os inibidores eram covalentes reversíveis ou irreversíveis. Os autores concluíram que o MQ/MM, com um potencial semi-empírico, é uma ferramenta eficaz e de baixo custo para prever a atividade biológica de inibidores covalentes, em comparação com métodos mais complexos (DA COSTA *et al.*, 2020). O método MQ/MM também é utilizado na formação de adutos, Grigorenko *et al.* (2022) utilizaram esse método para investigar a formação de adutos covalentes entre quatro compostos e o resíduo Cys¹⁴⁵ da protease principal do SARS-CoV-2, nomeada de M^{pro}. Assim, foi sugerido que Carmofur e Nirmatrelvir apresentam barreiras de energias de reação factíveis, sugerindo que esses fármacos são promissores para a inibição da M^{pro} (GRIGORENKO *et al.*, 2022).

Figura 4. Representação esquemática do modelo QM/MM



Fonte: Autora, 2025. Representação esquemática da metodologia híbrida MQ/MM aplicada a uma proteína. O círculo maior indica a região tratada com mecânica molecular (MM), enquanto o círculo menor representa a região tratada com mecânica quântica (MQ), destacando a área de maior interesse químico.

3.3 Abordagem de Cluster

A grande dificuldade de modelar uma enzima completa com métodos MQ é a demanda computacional, um sistema enzimático, em grande parte, possui milhares de átomos. A abordagem de cluster surge como uma metodologia, capaz de modelar reações enzimáticas, empregando QM em um pequeno modelo do sistema ao qual chamamos de

cluster, criado através de um recorte na proteína considerando os grupos funcionais mais importantes, para a reação avaliada, os resíduos do sítio ativo, por exemplo (GEORGIEVA e HIMO, 2010; LIAO *et al.*, 2011; SIEGBAHN e HIMO, 2011).

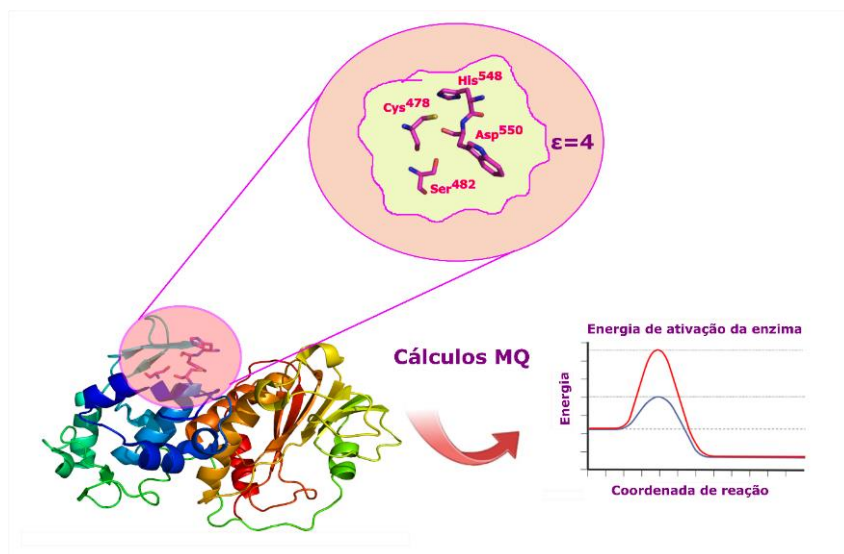
Essa abordagem é frequentemente utilizada para modelar estados de transição, bem como, identificar prováveis mecanismos de reação (LONSDALE *et al.*, 2012). Ao analisar apenas um “recorte” da proteína, o restante da enzima é desconsiderado. No entanto, o ambiente enzimático influencia toda a estrutura da proteína. Logo, um contínuo eletrostático é aplicado para representar, de forma aproximada, o efeito médio do restante do ambiente proteico (SHENG; HIMO, 2023).

Como mencionado anteriormente, a abordagem de cluster, envolve selecionar uma parte importante da enzima, geralmente o sítio ativo, e aplicar métodos avançados de estrutura eletrônica a esse modelo reduzido. Nas últimas décadas, o método de estrutura eletrônica mais comum tem sido a DFT, aplicado em modelos de cluster que variam entre 100 a 300 átomos (BOWLING; DASGUPTA; HERBERT, 2024).

São necessárias duas aproximações ao utilizar essa metodologia, a fim de evitar que efeitos como movimentos artificiais dos resíduos do sítio ativo e a polarização de longo alcance fornecida pelo ambiente enzimático comprometam os resultados (LONSDALE *et al.*, 2012). Primeiramente, é essencial fixar as coordenadas-chave nas margens do modelo para prevenir movimentos artificiais dos resíduos do sítio ativo durante a otimização (GEORGIEVA; HIMO, 2010). Outra aproximação importante, é a utilização da técnica de contínuo polarizável, em que os efeitos de polarização eletrostática do restante da enzima são modelados como um meio homogêneo polarizável, ver figura 5 (GEORGIEVA; HIMO, 2010). O método SMD (*Solvation Model Based on Density*) é um modelo de solvatação implícita. O SMD não apenas considera interações eletrostáticas entre o soluto e o meio contínuo polarizável, mas também incorpora efeitos de dispersão, cavitação e repulsão (OĞUZ; VASSETTI; LABAT, 2021).

Para evitar que o modelo se torne excessivamente rígido e produza valores de energia imprecisos, é importante não optar por um modelo muito pequeno. Modelos maiores proporcionam maior flexibilidade entre os resíduos, permitindo uma melhor descrição das reações (SIEGBAHN; HIMO, 2011).

Figura 5 – Desenho esquemático da abordagem de cluster.



Fonte: Autora, 2025.

Quanto maior for o modelo de cluster, menores são os efeitos de solvatação, pois há um aumento no número de grupos capazes de fornecer polarização intrínseca (GEORGIEVA e HIMO, 2010; SIEGBAHN e HIMO, 2011). A combinação dessas duas aproximações tem se mostrado um protocolo eficiente para elucidar mecanismos de reação (LIAO *et al.*, 2011).

A medida que o modelo de cluster aumenta, ocorre uma descrição mais precisa do sítio ativo da enzima. Nesse contexto, o bloqueio das coordenadas, aliado ao modelo de solvatação implícita, torna-se mais eficaz. A abordagem de cluster busca superar a limitação de avaliar toda a enzima em reações envolvendo quebra e formação de ligações químicas. Essa estratégia se concentra na modelagem do sítio ativo, dado que o tratamento computacional de toda a estrutura enzimática seria inviável devido ao elevado custo computacional.

O tamanho do cluster a ser avaliado depende tanto da demanda computacional quanto do método MQ selecionado, devendo, ainda, ser capaz de responder adequadamente à pergunta química em questão. É fundamental garantir que o resultado obtido seja quimicamente plausível, uma vez que o computador fornecerá um resultado, mas este precisa ser validado em termos de relevância química.

O método de DFT têm sido o mais utilizado nas últimas décadas (HIMO, 2017; SHENG; HIMO, 2023), principalmente o método híbrido, que utiliza o funcional de troca e correlação B3LYP (SIEGBAHN; HIMO, 2011), representado na equação (4) abaixo:

$$F^{B3LYP} = (1 - A) \cdot F_x^{Slater} + A \cdot F_x^{HF} + B \cdot F_x^{Becke} + C \cdot F_c^{LYP} + (1 - C) \cdot F_c^{VWN} \quad (4)$$

O termo F_x^{Slater} representa a troca de Slater, enquanto F_x^{HF} a troca exata de HF, F_x^{Becke} por sua vez é a parte do gradiente do funcional de troca, a correlação eletrônica é descrita por F_c^{LYP} e F_c^{VWN} . Os coeficientes A, B e C são determinados através de um ajuste baseado nos calores de formação experimentais. Segundo Siegbahn e Himo (2011), há três principais fontes de erro nos métodos de DFT. O erro de auto-interação gera uma contribuição artificial diferente de zero para a interação de um elétron com ele próprio.

Na teoria de HF, esse tipo de interação é cancelado exatamente pelo termo de troca desse elétron. Entretanto, na DFT, a interação coulombiana é descrita exatamente, mas a troca é apenas aproximada, resultando na ausência de cancelamento exato desses termos. Outra limitação dessa aproximação é a dissociação incorreta de uma ligação, por exemplo, H_2 , em uma mistura de fragmentos neutros e iônicos se houver uma restrição de spin nos orbitais.

O erro devido à descrição de determinante único e o erro de auto-interação se cancelam em grande parte dos casos, a remoção de um desses erros resulta em maiores erros, na maioria dos casos. E a terceira fonte de erro na DFT é a falta de interação de van der Waals, o que leva à erros significativos quando grandes sistemas iteragem (SIEGBAHN; HIMO, 2011).

Os métodos DFT, baseados nos fundamentos teóricos de Hohenberg, Kohn e Sham, utilizam a densidade eletrônica em vez de uma função de onda para determinar a energia de uma molécula (HOHENBERG; KOHN, 1964; KOHN; SHAM, 1965). Os referidos teoremas mostraram matematicamente que a energia do estado fundamental é completamente determinada pela densidade eletrônica, e também que a energia do estado fundamental é completamente determinada pela densidade eletrônica, bem como, que a energia do estado fundamental é mínima para a densidade ρ exata (HOHENBERG; KOHN, 1964).

Nas últimas décadas, estudos computacionais têm desempenhado um papel fundamental na investigação de reações enzimáticas, a DFT tem sido amplamente utilizada para modelar reações químicas em sistemas biológicos (WAPPETT; GOERIGK, 2021). No estudo de Goerigk e Wappett, a escolha dos funcionais DFT foi fundamentada em benchmarks recentes que avaliaram sua eficácia na descrição de reações catalisadas por enzimas, comparando desvios absolutos médios em relação a métodos de alta precisão, como DLPNO-CCSD/CBS. A definição do modelo do sítio ativo foi baseada na necessidade de equilibrar representatividade estrutural e viabilidade computacional

A escolha da abordagem de cluster para investigar a formação de um par

Cys(S⁻)/His(NH⁺) na protease nsP2 do CHIKV, ocorre pela sua capacidade de modelar quebra e formação de ligação de maneira eficiente e precisa, utilizando MQ. No contexto deste estudo, o modelo de cluster foi desenvolvido para investigar a ativação da enzima nsP2, que é mediada pela formação da díade catalítica Cys/His. Esse mecanismo envolve a transferência de próton entre os resíduos Cys⁴⁷⁸ e His⁵⁴⁸.

Além disso, busca-se determinar se a nsP2 do vírus CHIKV segue o mesmo mecanismo de ativação observado em outras proteases de alphavirus, isto é, por meio da formação de um par iônico que estabiliza o sítio catalítico. A confirmação desse mecanismo fornecerá a base necessária para o planejamento de inibidores eletrofílicos, capazes de explorar essa ativação e inibir a atividade da protease de forma eficiente.

Embora a abordagem de cluster represente uma aproximação, ela auxilia muito nesse tipo de investigação. Tratar a enzima completa seria inviável do ponto de vista computacional, tornando a abordagem de cluster uma solução prática para explorar as especificidades de reações enzimáticas. Ao concentrar-se no ‘corte’ mais importante da proteína, a abordagem de cluster permite a análise da transferência de próton, considerando o ambiente eletrostático que influencia toda a proteína, representado como um contínuo eletrostático.

Na últimas décadas, estudos computacionais têm sido fundamentais para o desenvolvimento de fármacos. Eles permitem uma compreensão detalhada dos mecanismos de ação dos alvos virais, possibilitando o planejamento racional de compostos terapêuticos com maior eficácia e especificidade.

Dessa forma, a escolha da metodologia de cluster nesta dissertação não apenas permite a investigação detalhada da ativação enzimática da nsP2, mas também representa uma contribuição para o campo da química computacional aplicada ao estudo de alvos virais, mais especificamente, no desenvolvimento de terapias eficazes e acessíveis para enfrentar as epidemias recorrentes de CHIKV.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Investigar a formação do par iônico Cys(S⁻)/His(NH⁺) no sítio ativo da protease nsP2 do CHIKV utilizando a metodologia de análise de clusters em Química Quântica, visando compreender o mecanismo reacional envolvido na ativação enzimática e contribuir para o desenvolvimento de fármacos direcionados a inibição da replicação viral.

4.1.1 Objetivos específicos

- Tratar o sítio ativo da protease nsP2 utilizando a abordagem de cluster por diferentes funcionais e bases, para identificar os grupos funcionais críticos, próximos à díade catalítica Cys⁴⁷⁸/His⁵⁴⁸.
- Simular o estado de transição para a transferência de próton entre os resíduos Cys⁴⁷⁸ e His⁵⁴⁸, avaliando as interações moleculares que facilitam a ativação enzimática.
- Explorar o efeito do ambiente eletrostático sobre o sítio ativo, utilizando um contínuo eletrostático para representar o impacto médio do ambiente proteico e do solvente na reação enzimática.

5 METODOLOGIA

5.1 Procedimento computacional

Os detalhes dos parâmetros de entrada utilizados nas simulações de DM e no cálculo dos parâmetros de otimização geométrica são descritos no anexos A.

5.2 Proteína nsP2 do CHIKV (PDB: 4ZTB)

A nsP2 do vírus CHIKV depositada no Banco de Dados PDB (Protein Data Bank), código 4ZTB, com resolução de 2,59 Å (Narwal *et al.* 2018), foi utilizada como input neste trabalho.

5.3 Simulação de Dinâmica molecular

A estrutura da nsP2 do CHIKV resolvida por cristalografia de raio-X (2.59 Å resolução) foi obtida no RCSB Protein Data Bank (<https://www.rcsb.org/>), sob código 4ZTB (NARWAL *et al.*, 2018). Posteriormente, o servidor web H++ (<http://newbiophysics.cs.vt.edu/H++/>) foi utilizado para adicionar de modo acurado todos os hidrogênios à macromolécula. Então, o H++ previu os valores de pKa desses resíduos ionizáveis, permitindo uma compreensão detalhada de seu estado de protonação em diferentes condições de pH. Em seguida, a proteína (.pdb*) foi previamente preparada utilizando o módulo *Protein Preparation Wizard* do pacote de software Desmond® (licenciado academicamente e distribuído pela equipe de pesquisa da D. E. Shaw, (https://www.deshawresearch.com/downloads/download_desmond.cgi/)). Posteriormente, o potencial intermolecular transferível com 4 pontos (TIP4P) modelo foi usado para descrever as moléculas explícitas de água, contidas em uma caixa ortorrômbica (10 Å³ a partir das bordas).

O sistema macromolecular foi neutralizado pela adição de dois átomos de cloreto (Cl⁻) e, em seguida, os íons Na⁺ e Cl⁻ foram adicionados a uma concentração de 0.15 M, gerando um ambiente fisiológico isoeletrônico. Em seguida, o campo de força *Optimized Potentials for Liquid Simulations* 2005 (OPLS_2005) foi utilizado para minimizar a energia de todo o sistema, com um tempo de minimização de 50 ps (SILVA *et al.*, 2017). Então, o sistema completo foi energeticamente minimizado para relaxar potenciais choques estéricos na estrutura e, em seguida, o equilíbrio constante de número de partículas, pressão e temperatura (NPT) foi admitido à 300 K e 1 bar (SANTOS-JÚNIOR *et al.*, 2024). Posteriormente, foram efetuadas 100 ns simulações de dinâmica molecular (DM)

para obter dados sobre a estabilidade da proteína, utilizando um intervalo de registro (trajetória) de 100 ps e aproximadamente 1.000 estruturas. Além disso, foram gerados gráficos de Desvio da raiz quadrada média (RMSD) e Flutuação da raiz quadrada média (RMSF) utilizando o Maestro® v. 2022.1 (<https://www.deshawresearch.com/resources.html>) (SILVA-JUNIOR *et al.*, 2017; SOUZA *et al.*, 2023).

O RMSD mede a diferença entre as posições atômicas da trajetória simulada e a estrutura cristalográfica de referência (DEEBA *et al.*, 2017; SOUZA *et al.*, 2023). O cálculo de RMSD foi realizado conforme a equação 5.

$$RMSD(t_1, t_2) = \left[\frac{1}{M} \sum_{i=1}^N m_i ||r_i(t_1) - r_i(t_2)||^2 \right]^{1/2} \quad (5)$$

Onde $M = \sum_{i=1}^N m_i$ e $r_i(t)$ é a posição do átomo i no tempo t . A variável t_2 representa o tempo utilizado para definir a posição do átomo i na estrutura de referência, ou seja, a estrutura inicial ($t_2 = 0$) (BHACHOO e BEUMING, 2017; JAIN *et al.*, 2017; VORA *et al.*, 2019).

O gráfico de RMSF representa a flutuação média quadrática dos resíduos da proteína nsP2 do CHIKV ao longo de seu índice de resíduos, ou seja, é uma medida de flexibilidade ou mobilidade dos resíduos da proteína. As variações do valor de RMSF são calculadas da seguinte forma:

$$RMSF_i = \sqrt{\frac{1}{T} \sum_{t=1}^T (x_i(t) - \langle x_i \rangle)^2} \quad (6)$$

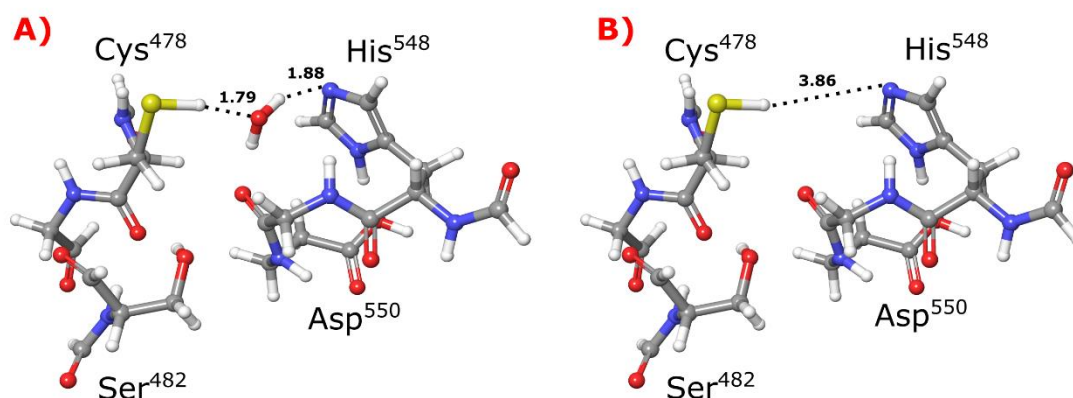
Para obter a estrutura final da nsP2 (pós-DM) mais representativa para investigação adicional, uma análise de clusters foi realizada considerando toda a trajetória da MD (SANTOS-JÚNIOR *et al.*, 2024). Posteriormente, o modelo obtido em conformação nativa foi utilizado para estudos de Teoria do Funcional da Densidade (TFD), usando uma abordagem em cluster.

5.4 Preparação da abordagem de cluster

A abordagem de cluster tornou-se um pilar no estudo de mecanismos de reações enzimáticas devido à sua capacidade de equilibrar eficiência computacional e precisão química. Focando em um subconjunto estrategicamente selecionado do sítio ativo da enzima, essa abordagem permite modelar interações-chave e propriedades eletrônicas que impulsionam a atividade catalítica, ao mesmo tempo que evita o custo computacional

proibitivo de simular toda a proteína. Esse método tem sido particularmente valioso para elucidar vias reacionais complexas, fornecendo percepções sobre estados de transição, espécies intermediárias e o papel de resíduos ou cofatores específicos, contribuindo, em última instância, para um entendimento mais profundo da função enzimática e para o desenvolvimento de catalisadores biomiméticos (LIAO; SIEGBAHN, 2019, 2017; SIEGBAHN; HIMO, 2009; V. BARONE, 1998). Assim, com base no modelo pós-DM, foi construído um cluster molecular para investigar o mecanismo de reação por meio de cálculos de DFT. Esse modelo incluiu os resíduos Cys⁴⁷⁸ e His⁵⁴⁸, responsáveis por formar o par iônico Cys(S⁻)/His(NH⁺), essencial para a função enzimática. O resíduo Asp⁵⁵⁰, cuja função é estabilizar a carga de His⁵⁴⁸, também foi incluído. Adicionalmente, o resíduo Ser⁴⁸² foi incorporado devido à sua possível participação na reação, conforme sugerido pelo estudo de SAISAWANG *et al.*, 2015. Além disso, uma molécula de água foi posicionada, a partir da simulação de DM, entre Cys⁴⁷⁸ e His⁵⁴⁸, com distâncias de 1,79 Å (SH...OH₂) e 1,88 Å (N...H₂O) no modelo I, e 3,86 Å (SH...N) no modelo II (Fig. 6).

Figura 6. Modelos tridimensionais utilizados nos estudos de ativação catalítica da nsP2 do CHIKV por meio de simulações de DM.



Fonte: Autora, 2025. Em (A), modelo I – presença explícita de uma molécula de água; em (B), modelo II – ambiente a vácuo. Todos os átomos de hidrogênio, carbono, nitrogênio, oxigênio e enxofre estão representados nas cores branca, cinza, azul, vermelha e amarela, respectivamente.

5.5 Cálculos DFT

Neste estudo, as otimizações geométricas e os cálculos de frequências vibracionais foram realizados utilizando o funcional de troca-correlação ω B97-XD (CHAI; HEAD-GORDON, 2008). Os átomos dos sistemas foram descritos utilizando as funções de conjunto de base de polarização de valência dividida (SVP). Os estados de transição foram

caracterizados por apresentar apenas uma frequência imaginária, enquanto os reagentes e os produtos não apresentaram frequências imaginárias. As estruturas dos reagentes e produtos conectados via estado de transição foram obtidas a partir do cálculo da coordenada intrínseca de reação (IRC) (FUKUI, 1981). Todos os cálculos de MQ foram realizados utilizando a versão D.01 do código Gaussian 09 (G.W.T. M. J. FRISCH H. B. SCHLEGEL G. E. SCUSERIA *et al.*, 2013).

Após as otimizações geométricas, as energias foram refinadas por meio de cálculos de ponto único empregando conjuntos de bases maiores, especificamente valência tripla-zeta com duas funções de polarização (TZVPP) e valência quádrupla-zeta com funções de polarização (QZVP), respectivamente (WEIGEND, 2006; WEIGEND; AHLRICH, 2005).

Os efeitos eletrostáticos do ambiente proteico mais amplo foram modelados utilizando o Modelo de solvatação baseado em Densidade (SMD), considerando diferentes constantes dielétricas ($\epsilon = 4, 15, 30, 60$ e 80) (TOMASI; MENNUCCI; CAMMI, 2005). O desempenho dos funcionais de DFT XC foi avaliado a partir de cálculos utilizando os funcionais Becke 3 Lee-Yang-Parr (B3LYP) (BECKE, 1993b; LEE; YANG; PARR, 1988), Minnesota 06 (M06) (ZHAO; TRUHLAR, 2008), Becke's Half-and-Half Lee-Yang-Parr (BHandLYP) (BECKE, 1993a) e Threshold Pseudopotential-Symmetry-Adapted Hybrid (TPSSH) (STAROVEROV *et al.*, 2003; TAO *et al.*, 2003), todos com o conjunto de base QZVP.

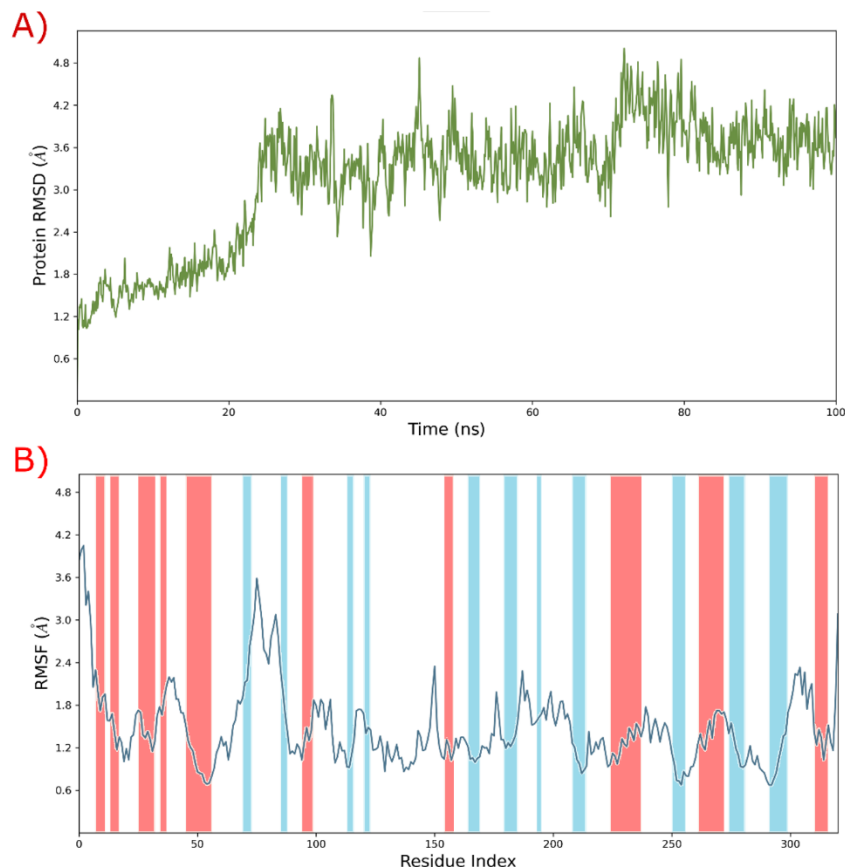
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Simulação de Dinâmica Molecular

O uso de simulações de DM antes dos cálculos de otimização é essencial para obter uma conformação estrutural inicial mais realista. Isso permite que os cálculos de otimização sejam realizados em uma estrutura já relaxada e mais próxima de seu estado nativo (BUSLAEV *et al.*, 2022) (PADHI; JANEŽIČ; ZHANG, 2022). Assim, neste trabalho, utilizamos simulações de DM para construir um modelo molecular inicial a fim de investigar a reação de transferência de prótons envolvendo os resíduos Cys⁴⁷⁸ e His⁵⁴⁸.

No gráfico de RMSD (Fig. 7A) para a nsP2 do CHIKV ao longo de 100 ns de simulações de DM, observa-se um aumento inicial no valor de RMSD até 1,2 Å, indicando que a estrutura simulada permanece relativamente próxima da estrutura cristalográfica no início da simulação. Posteriormente, o RMSD aumenta gradualmente, atingindo aproximadamente 2,0 Å em torno de 30 ns. Esse aumento inicial no RMSD sugere que a proteína está se ajustando e acomodando ao ambiente de solução, como esperado em estudos de DM. Após essa fase de ajuste, o valor de RMSD apresenta variações, estabilizando-se em uma faixa relativamente consistente de 2,0–2,8 Å, com picos ocasionais atingindo aproximadamente ~3,6 Å. Essas variações indicam que a proteína continua a explorar diferentes conformações antes de alcançar a estabilidade. Os picos mais altos podem estar associados a movimentos conformacionais mais significativos ou a ajustes temporários da proteína ao longo da simulação. Assim, a análise do gráfico de RMSD sugere que a estrutura do backbone da nsP2 permanece estável durante os 100 ns de simulação, com variações típicas para proteínas em solução. O confinamento dos valores de RMSD em uma faixa relativamente estreita após o período inicial de ajuste indica que não ocorreram desvios estruturais significativos ou eventos de desenovelamento durante a simulação.

Figura 7. Gráficos de desvio quadrático médio (RMSD) e flutuação quadrática média (RMSF) para a nsP2 do vírus Chikungunya (PDB: 4ZTB) ao longo de 100 ns de simulações de dinâmica molecular (MD).



Fonte: Autora, 2025. Em (A), gráfico do backbone em verde, mostrando variações estruturais (Å). Em (B), flutuações ao longo de 100 ns de simulações de DM, em que as alfa-hélices estão coloridas em azul, enquanto as folhas-beta e as regiões de loops estão representadas em vermelho pálido e branco, respectivamente.

A linha azul no gráfico representa o RMSF dos átomos de carbono alfa ao longo da sequência de resíduos da proteína. Os valores no eixo vertical representa a posição dos resíduos ao longo da sequência da proteína (Figura 10).

O gráfico de RMSF (Fig. 7B) representa uma medida da flexibilidade ou mobilidade dos resíduos da proteína sob as condições simuladas. Regiões com picos altos de RMSF (> 3 Å) indicam resíduos ou segmentos da proteína mais flexíveis ou móveis durante a simulação (FAISAL *et al.*, 2021; MEMON *et al.*, 2021). Esses picos podem sugerir regiões de desordem intrínseca ou partes da proteína envolvidas em movimentos significativos, como loops (LILIH SITI SOLIHAT, KAZUTOMO KAWAGUCHI, 2024). Especificamente, os resíduos Asp⁵⁵⁰ e His⁵⁴⁸, que fazem parte do sítio ativo da nsP2, estão localizados em regiões mais flexíveis com altos valores de RMSF, sugerindo que a maior flexibilidade dessas áreas pode ser importante para o mecanismo catalítico da enzima.

Regiões com valores baixos de RMSF ($< 1,5 \text{ \AA}$) são mais rígidas e estáveis (KUMAR *et al.*, 2020). Essas áreas geralmente correspondem a partes estruturais bem definidas da proteína, como alfa-hélices ou folhas-beta, que mantêm uma conformação relativamente constante (S. RUSSELL LEHRMAN, 1990). Os resíduos Ser⁴⁸² e Cys⁴⁷⁸ exibem valores baixos de RMSF, indicando que estão em regiões mais rígidas e estáveis, essenciais para manter a integridade estrutural necessária para a atividade catalítica.

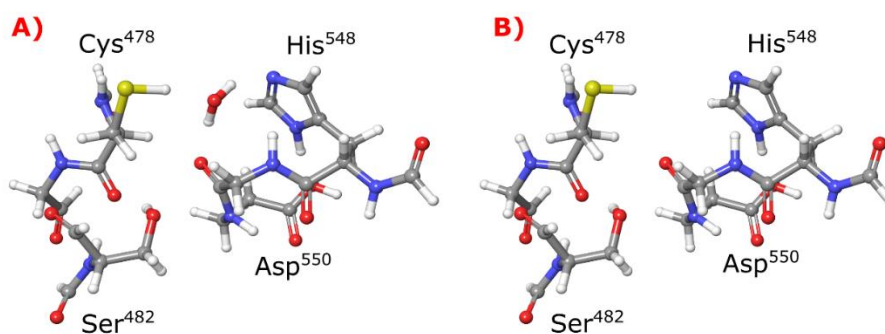
6.2 Mecanismo de Reação: Cálculos DFT de Abordagem de cluster

O sítio ativo da nsP2 do CHIKV está localizado em uma região exposta ao solvente (NARWAL *et al.*, 2018), sugerindo que a água pode catalisar a formação do par iônico, para ativação dessa protease. Embora nenhum estudo tenha avaliado essa possibilidade, essa ativação enzimática foi considerada, e dois modelos reacionais foram utilizados: um contendo uma molécula de água entre os resíduos ácido-base de Brønsted-Lowry (modelo I) e outro sem a molécula de água (modelo II). Em ambos os modelos, os resíduos Ser⁴⁸², Cys⁴⁷⁸, His⁵⁴⁸ e Asp⁵⁵⁰ estão presentes (Figura 6).

Após a análise dos clusters gerados durante as simulações de DM, foi obtida uma estrutura mais representativa da nsP2 do CHIKV. Essa estrutura foi utilizada para criar dois modelos tridimensionais (considerando um raio de $4,0 \text{ \AA}$ ao redor da díade catalítica – Cys⁴⁷⁸ e His⁵⁴⁸) para estudos sobre o mecanismo de ativação da nsP2 do CHIKV. O Modelo I (Fig. 8A) incluiu uma molécula de água entre os resíduos da díade ácido-base, Cys⁴⁷⁸ e His⁵⁴⁸ (essa molécula de água foi originada do ambiente solvatado criado durante a simulação de 100 ns de DM). Ao mesmo tempo, o Modelo II não incluía água, representando um ambiente de vácuo (Fig. 8B).

Após a otimização do modelo I, observou-se que a molécula de água atua como catalisador na transferência de prótons, capturando o próton do resíduo Cys⁴⁷⁸ e doando-o para o resíduo His⁵⁴⁸ em um mecanismo concertado. Isso foi confirmado após a otimização do estado de transição. O estado de transição foi caracterizado por apresentar uma frequência imaginária de $464,43i$. O autovetor associado a essa frequência imaginária indica um mecanismo concertado de transferência de prótons, no qual, simultaneamente à quebra da ligação S-H, ocorre a formação da ligação H-N (Figura 8).

Figura 8. Modelos tridimensionais pós-simulação de dinâmica molecular utilizados para os estudos de ativação catalítica da nsP2 do CHIKV por meio de cálculos de Teoria do Funcional da Densidade (DFT).

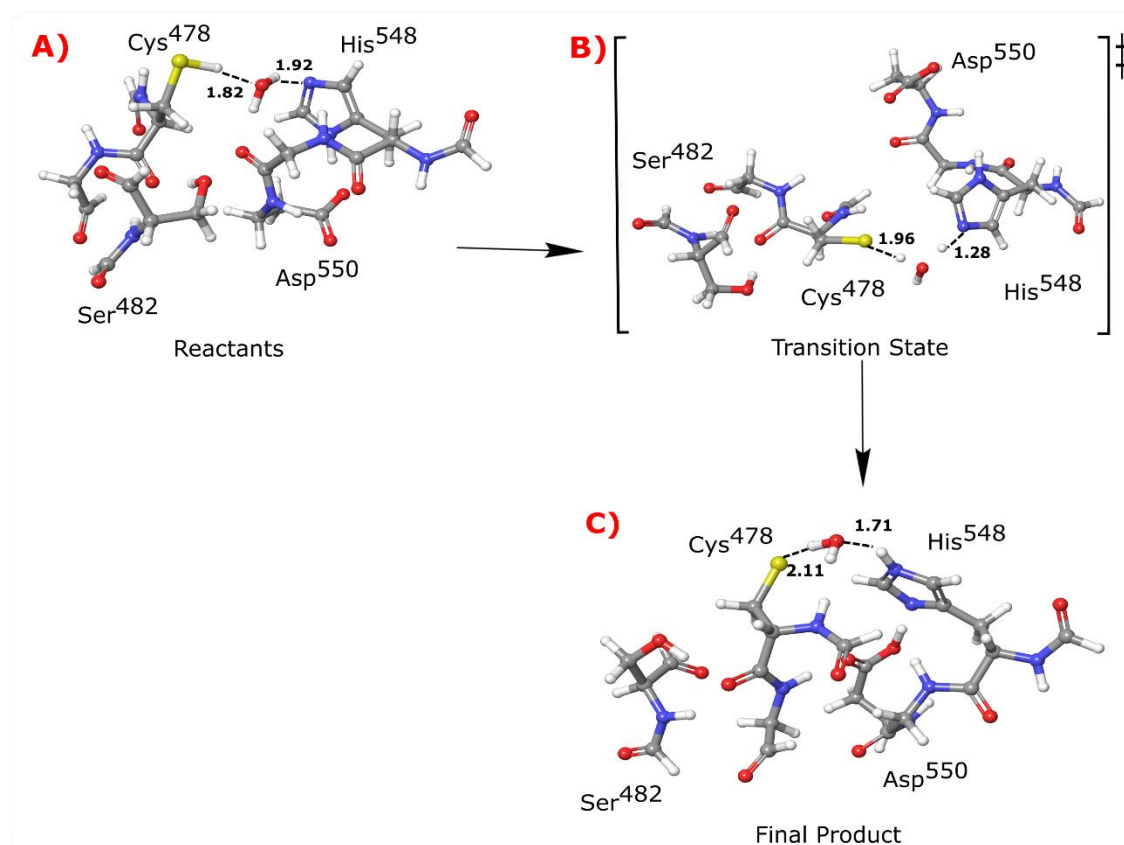


Fonte: Autora, 2025. Em (A), modelo I – presença explícita de uma molécula de água; em (B), modelo II – ambiente a vácuo. Todos os átomos de hidrogênio, carbono, nitrogênio, oxigênio e enxofre estão representados nas cores branca, cinza, azul, vermelha e amarela, respectivamente.

Após a otimização geométrica do Modelo I, foi realizado um alinhamento estrutural entre o cluster obtido pós-DM e o cluster otimizado por DFT, resultando em um RMSD de 0,542 Å. Esse resultado sugere que, apesar das diferenças nos métodos empregados, a geometria do modelo otimizado retém características essenciais da conformação intermediária gerada durante a simulação de 100 ns de MD.

Utilizando o nível de teoria ω B97-XD/SVP para tratar o Modelo I, que inclui uma molécula de água entre os resíduos Cys⁴⁷⁸ e His⁵⁴⁸, observou-se que o átomo de oxigênio da molécula de água está a uma distância de 1,82 Å do hidrogênio do grupo tiol (S–H, Cys⁴⁷⁸), enquanto seu hidrogênio está a uma distância de 1,92 Å do nitrogênio do grupo imidazol (C=N, His⁵⁴⁸). Isso sugere um possível papel da água no mecanismo de ativação da nsP2 do CHIKV (Fig. 9A). Após a otimização do Modelo I, foi observado que a molécula de água pode atuar como catalisador na transferência de prótons, capturando o próton do Cys⁴⁷⁸ e doando-o ao His⁵⁴⁸ em um mecanismo concertado. Isso foi confirmado após a otimização do estado de transição. O autovetor associado a essa frequência imaginária indica um mecanismo concertado de transferência de prótons, no qual, simultaneamente à quebra da ligação S–H, ocorre a formação da ligação H–N (Fig. 9B). Após a transferência de prótons, as distâncias intermoleculares (S[−]⋯H–OH e HN⁺⋯OH₂) mudaram para 2,11 Å e 1,71 Å, respectivamente, no produto final (Fig. 9C).

Figura 9. Estruturas otimizadas do reagente, estado de transição e produto obtidas com o nível de teoria ω B97X-D/SVP.



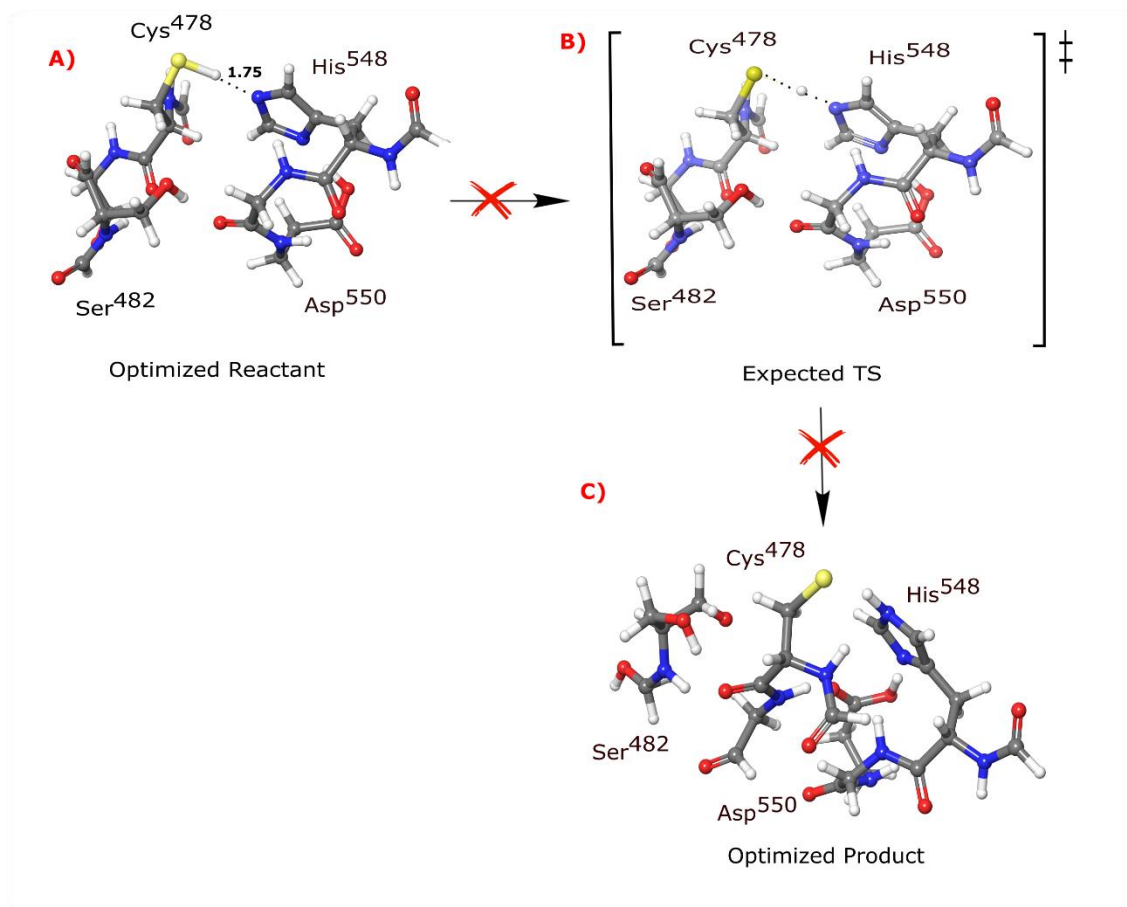
Fonte: Autora, 2025. Todas as interações intermoleculares estão representadas por linhas pontilhadas pretas, com os valores das distâncias expressos em Å.

Com relação ao Modelo II (Fig. 10), uma vez que o protocolo utilizado para o Modelo I mostrou-se bem-sucedido, optamos por aplicar o nível de teoria ω B97-XD/SVP para tratar este modelo também. No entanto, não foi possível localizar um estado de transição possível para a transferência de prótons sem a presença de água, mesmo após várias tentativas considerando diferentes combinações de funcionais de troca-correlação (XC) e conjuntos de base (ver SI).

Adicionalmente, as distâncias interatômicas e os ângulos de ligação entre os átomos envolvidos na formação do par iônico foram ajustados para "facilitar" o progresso da reação, mas isso também não teve sucesso. Em todas as tentativas avaliadas, o próton sempre retornava ao átomo de enxofre do resíduo Cys⁴⁷⁸. Assim, nossos resultados sugerem que a molécula de água é crucial para estabilizar o estado de transição, facilitando a transferência de prótons ao mediar a distribuição de densidade eletrônica entre os resíduos Cys⁴⁷⁸ e His⁵⁴⁸. Talvez o sistema siga um mecanismo diferente na ausência de

água e/ou não consiga superar a barreira energética necessária para a reação, ao menos nas condições investigadas.

Figura 10. Estruturas otimizadas para o reagente e o produto obtidas pelo nível de teoria ω B97-XD/SVP, e um estado de transição esperado.



Fonte: Autora, 2025. Todas as distâncias interatômicas entre os resíduos Cys⁴⁷⁸ e His⁵⁴⁸ estão expressas em Å.

6.3 Efeitos do Ambiente Eletrostático

Os efeitos do ambiente eletrostático foram incorporados por meio de cálculos de ponto único realizados nas estruturas do reagente, estado de transição e produto, aplicando o modelo SMD com diferentes constantes dielétricas: $\epsilon = 4$ (ambiente altamente apolar e hidrofóbico) e $\epsilon = 80$ (ambiente polar e hidrofílico) para o Modelo I. Os resultados energéticos estão listados na Tabela 1. Inicialmente, avaliou-se o efeito do conjunto de bases na geometria e nas energias da reação de transferência de prótons. A Tabela 1 mostra que não houve mudanças significativas na energia de ativação ao modificar o conjunto de bases de TZVP para TZVPP e, em seguida, para QZVP, tanto para $\epsilon = 4$ quanto para $\epsilon = 80$.

Tabela 1. Efeitos de diferentes conjuntos de base usando o funcional ω B97-XD nos valores da barreira de energia do estado de transição ($\Delta G^\ddagger$) para o mecanismo concertado de transferência de próton catalisado por água, envolvendo a díade catalítica da nsP2 do CHIKV.

Dielectric constant (ϵ)	ω B97-XD/basis set ($\Delta G^\ddagger$ in kcal/mol)		
	TZVP	TZVPP	QZVP
4,0	23,0	23,0	21,0
80,0	16,0	16,0	13,0

As diferenças nas energias ficaram na faixa de 1,0 kcal/mol. Por outro lado, a polaridade do ambiente químico promove uma mudança significativa na cinética do processo de transferência de prótons. Considerando os resultados obtidos com o conjunto de bases QZVP, o aumento de 4,0 para 80,0 na constante dielétrica reduz a energia de ativação em cerca de 7,0 kcal/mol. Esses resultados sugerem que o solvente é um fator significativo na reação química de transferência de prótons, reduzindo a barreira de ativação por meio da estabilização do estado de transição, destacando a importância do solvente no processo, especialmente considerando que o sítio ativo da enzima está localizado em uma região altamente exposta ao solvente. Assim, é plausível assumir que um ambiente altamente eletrostático é crucial para o processo de transferência de prótons nesta condição de par iônico. Isso ressalta a relevância da polarização do solvente no mecanismo investigado.

Para entender a distribuição de cargas atômicas parciais ao longo da reação, as cargas de Mulliken para $\epsilon = 80$ (a condição com cinética mais rápida) foram calculadas considerando os funcionais B3LYP, M06, TPSSh e BHandLYP com o conjunto de bases QZVP. Os valores de carga de Mulliken para os átomos de S, H e N no reagente, no estado de transição e no produto estão apresentados na Tabela 2.

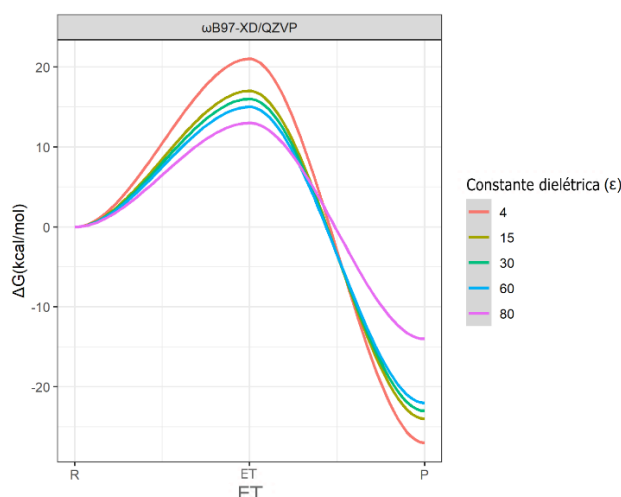
Tabela 2. Cargas de Mulliken para as estruturas do reagente, estado de transição (TS) e produto na transferência de próton catalisada por água entre Cys⁴⁷⁸ e His⁵⁴⁸ da nsP2 do CHIKV, com $\epsilon = 80$, calculadas no nível de teoria ω B97X-D/QZVP.

Reagente				
Atoms	B3LYP	M06	TPSSh	BHandLYP
S	-0.307	-0.332	-0.357	-0.283
H	0.129	0.124	0.177	0.138
N	-0.501	-0.937	-0.371	-0.514
ET				
S	-0.859	-0.977	-0.845	-0.841
H	0.307	0.235	0.319	0.317
N	-0.428	-0.622	-0.359	-0.427
Produto				
S	-0.935	-0.970	-0.891	-0.909
H	0.275	0.248	0.287	0.292
N	-0.294	-0.560	-0.233	-0.317

A análise geral dos dados apresentados na Tabela 2 indica que, independentemente do funcional XC, do reagente ao produto, as cargas atômicas parciais sobre o enxofre do resíduo Cys⁴⁷⁸ tornam-se mais negativas, o que está de acordo com a formação da espécie S⁻. Por outro lado, ao longo do avanço da reação de transferência de prótons, a carga atômica parcial sobre o átomo de nitrogênio aceitador do resíduo His⁵⁴⁸ torna-se menos negativa, sugerindo uma redução na carga atômica sobre o nitrogênio devido à formação da ligação química H–N. Além disso, vale destacar que a Tabela 2 indica que, do reagente ao produto, a carga atômica parcial sobre o átomo de hidrogênio transferido aumenta, sugerindo a formação de uma espécie química mais próxima de um próton.

O perfil energético completo para a reação de transferência de prótons calculado no nível de teoria ω B97-XD/QZVP está apresentado na Tabela 1. Além da análise cinética da reação apresentada e discutida anteriormente, a análise termodinâmica revelou que a transferência de prótons do resíduo Cys⁴⁷⁸ para o resíduo His⁵⁴⁸, mediada por uma molécula de água, é um processo termodinamicamente favorável. A energia de reação (Fig.11) varia conforme a constante dielétrica do meio: no meio hidrofóbico ($\epsilon = 4$), a energia de reação foi de aproximadamente -27,0 kcal/mol, enquanto no meio hidrofílico ($\epsilon = 80$), foi de -14 kcal/mol.

Figura 11. Perfil da energia livre de Gibbs (ΔG) ao longo da coordenada de reação para diferentes constantes dielétricas (ϵ), calculado com o funcional ω B97-XD e o conjunto de base QZVP.



Fonte: Autora, 2025.

Essa variação indica que a reação é mais termodinamicamente favorável em meios hidrofóbicos. Esse cenário dependerá da quantidade de água na região reativa, do pH fisiológico e do estado termodinâmico (temperatura, pressão, etc).

Subsequentemente, a sensibilidade dos resultados à natureza do funcional de troca e correlação foi investigada utilizando diferentes constantes dielétricas ($\epsilon = 4, 15, 30, 60$ e 80). Cálculos de ponto único (SP) foram realizados com os funcionais B3LYP, M06, TPSSh e BHandLYP, utilizando o conjunto de bases QZVP, selecionado devido ao seu tamanho maior e, conseqüentemente, à sua maior precisão nos valores de energia. Os resultados estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3 – Estado de transição ($\Delta G^\ddagger$) usando diferentes funcionais de exchange-correlation para a transferência do próton entre Cys⁴⁷⁸ e His⁵⁴⁸ da nsP2 do CHIKV.

Dielectric constant (ϵ)	Functional/QZVP ($\Delta G^\ddagger$ in kcal/mol)			
	B3LYP	M06	TPSSh	BHandLYP
4	21.0	23.0	20.0	24.0
15	17.0	19.0	16.0	16.0
30	16.0	18.0	15.0	19.0
60	15.0	17.0	15.0	18.0
80	14.0	16.0	13.0	17.0

Os valores apresentados na Tabela 3 mostram uma redução significativa na barreira de ativação à medida que os valores de constante dielétrica aumenta (Tabela 3), independentemente do funcional utilizado. Essa tendência está alinhada com estudos

anteriores que destacam o papel de ambientes polares na estabilização de estados de transição por meio de interações eletrostáticas (SUPPAN, 1990) No caso específico da reação de transferência de prótons analisada, onde o produto final é um par iônico Cys(S⁻)/His(NH⁺), um meio altamente polar desempenha um papel crítico. Esse ambiente favorece a estabilização de estados carregados, reduzindo significativamente a energia necessária para superar a barreira de ativação (CORTES-CLERGET *et al.*, 2021). Em termos quantitativos, a Tabela 3 indica que a variação entre as energias de ativação calculadas com os funcionais não excede 4,0 kcal/mol.

7 CONCLUSÕES

O presente estudo avaliou a formação do par iônico Cys⁴⁷⁸(S⁻)/His⁵⁴⁸(NH⁺), o passo inicial na ativação enzimática da protease nsP2 do CHIKV. Simulações de DM e metodologias de análise de clusters em MQ foram empregadas, com o objetivo principal de entender a reação de desprotonação envolvida na ativação enzimática. Esta investigação considerou como uma molécula de água poderia catalisar a reação, visando contribuir para o desenvolvimento de medicamentos que inibam a replicação viral do CHIKV.

Os resultados demonstraram que a proteína nsP2 do CHIKV é ativada por uma molécula de água (modelo I), tornando-se uma proteína nucleofílica, o que caracteriza a nsP2 do CHIKV como uma CP de fato.

A conclusão de que o mecanismo é catalisado por água é apoiada pela identificação do ET e pela observação de que a barreira de ativação diminui significativamente em um ambiente de maior polaridade, ou seja, com uma constante dielétrica maior. Isso indica que o mecanismo ocorre em um ambiente hidrofílico. Cálculos de energia de ponto único usando diferentes funcionais de troca e correlação mostraram que os valores de ET foram consistentemente mais baixos para $\epsilon = 80$ em comparação com $\epsilon = 4, 15, 30$ e 60 , sugerindo que o ambiente polar estabiliza melhor o ET, resultando em uma barreira de ativação mais baixa. Isso corrobora a hipótese de que a formação do par iônico é catalisada por uma molécula de água. A redução da barreira de ativação em um meio polar pode ser devido à exposição do sítio ativo da nsP2 do CHIKV ao solvente.

Os achados sugerem que o mecanismo é concertado. Essa conclusão é baseada na análise do ET identificado, que indica que a protonação do resíduo His⁵⁴⁸ e a desprotonação do resíduo Cys⁴⁷⁸ ocorrem simultaneamente. Assim, este estudo avançou na compreensão da ativação enzimática da protease nsP2 do CHIKV, enfatizando a importância do ambiente eletrostático na catálise enzimática e destacando o papel fundamental da água no mecanismo.

8 REFERÊNCIAS

ABDELNABI, R. et al. Protein kinases C as potential host targets for the inhibition of chikungunya virus replication. **Antiviral Research**, v. 139, p. 79–87, mar. 2017.

ABDELNABI, R.; NEYTS, J.; DELANG, L. Towards antivirals against chikungunya virus. **Antiviral Research**, v. 121, p. 59–68, set. 2015.

ABDULLAH, N. et al. The Putative Roles and Functions of Indel, Repetition and Duplication Events in Alphavirus Non-Structural Protein 3 Hypervariable Domain (nsP3 HVD) in Evolution, Viability and Re-Emergence. **Viruses**, v. 13, n. 6, p. 1021, 28 maio 2021.

AHOLA, T.; MCINERNEY, G.; MERITS, A. Alphavirus RNA replication in vertebrate cells. In: [s.l: s.n.]. p. 111–156.

ALBUQUERQUE, E. et al. **Quantum Chemistry Simulation of Biological Molecules**. [s.l.] Cambridge University Press, 2020.

ARAFET, K. et al. Quantum Mechanics/Molecular Mechanics Studies of the Mechanism of Falcipain-2 Inhibition by the Epoxysuccinate E64. **Biochemistry**, v. 53, n. 20, p. 3336–3346, 27 maio 2014.

ARAFET, K.; FERRER, S.; MOLINER, V. First Quantum Mechanics/Molecular Mechanics Studies of the Inhibition Mechanism of Cruzain by Peptidyl Halomethyl Ketones. **Biochemistry**, v. 54, n. 21, p. 3381–3391, 2 jun. 2015.

ARGÜELLO-GARCÍA, R.; CARRERO, J. C.; ORTEGA-PIERRES, M. G. Extracellular Cysteine Proteases of Key Intestinal Protozoan Pathogens—Factors Linked to Virulence and Pathogenicity. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 16, p. 12850, 16 ago. 2023.

BARAQUE DE FREITAS RODRIGUES, S. et al. Quantum Chemistry in Drug Design: Density Function Theory (DFT) and Other Quantum Mechanics (QM)-related Approaches. In: **Applied Computer-Aided Drug Design: Models and Methods**. [s.l.] BENTHAM SCIENCE PUBLISHERS, 2023. p. 258–309.

BECKE, A. D. A new mixing of Hartree–Fock and local density-functional theories. **The Journal of Chemical Physics**, v. 98, n. 2, p. 1372–1377, 15 jan. 1993a.

BECKE, A. D. Density-functional thermochemistry. III. The role of exact exchange. **The Journal of Chemical Physics**, v. 98, n. 7, p. 5648–5652, 1 abr. 1993b.

BELLA L. GRIGORENKO , IGOR V. POLYAKOV , GORAN GIUDETTI , SHIRIN FARAJI , ANNA I. KRYLOV, A. V. N. QM/MM Simulations of the Covalent Inhibition of the SARS-CoV-2 Main Protease: Four Compounds and Three Reaction Mechanisms. **ChemRxiv**, 2022.

BERGER, K. H.; YAFFE, M. P. Prohibitin Family Members Interact Genetically with Mitochondrial Inheritance Components in *Saccharomyces cerevisiae*. **Molecular and Cellular Biology**, v. 18, n. 7, p. 4043–4052, 1 jul. 1998.

BERNARD, E. et al. Endocytosis of Chikungunya Virus into Mammalian Cells: Role of

Clathrin and Early Endosomal Compartments. **PLoS ONE**, v. 5, n. 7, p. e11479, 8 jul. 2010.

BETTIS, A. A. et al. The global epidemiology of chikungunya from 1999 to 2020: A systematic literature review to inform the development and introduction of vaccines. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 16, n. 1, p. e0010069, 12 jan. 2022.

BHACHOO, J.; BEUMING, T. Investigating Protein–Peptide Interactions Using the Schrödinger Computational Suite. In: [s.l: s.n.]. p. 235–254.

BHATI, A. P. et al. Long Time Scale Ensemble Methods in Molecular Dynamics: Ligand–Protein Interactions and Allostery in SARS-CoV-2 Targets. **Journal of Chemical Theory and Computation**, v. 19, n. 11, p. 3359–3378, 13 jun. 2023.

BHATT, P. et al. Binding interaction of glyphosate with glyphosate oxidoreductase and C–P lyase: Molecular docking and molecular dynamics simulation studies. **Journal of Hazardous Materials**, v. 409, p. 124927, maio 2021.

BOURJOT, M. et al. Prostratin and 12- O -Tetradecanoylphorbol 13-Acetate Are Potent and Selective Inhibitors of Chikungunya Virus Replication. **Journal of Natural Products**, v. 75, n. 12, p. 2183–2187, 28 dez. 2012.

BOWLING, P. E.; DASGUPTA, S.; HERBERT, J. M. Eliminating Imaginary Vibrational Frequencies in Quantum-Chemical Cluster Models of Enzymatic Active Sites. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 64, n. 9, p. 3912–3922, 13 maio 2024.

BURTON, N. A. et al. Prediction of the mechanisms of enzyme-catalysed reactions using hybrid quantum mechanical/molecular mechanical methods. **Faraday Discussions**, v. 110, p. 463–475, 1998.

BUSLAEV, P. et al. Best Practices in Constant pH MD Simulations: Accuracy and Sampling. **Journal of Chemical Theory and Computation**, v. 18, n. 10, p. 6134–6147, 11 out. 2022.

CHAI, J.-D.; HEAD-GORDON, M. Long-range corrected hybrid density functionals with damped atom–atom dispersion corrections. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 10, n. 44, p. 6615, 2008.

CHATTERJEE, P. K.; VASHISHTHA, M.; KIELIAN, M. Biochemical Consequences of a Mutation That Controls the Cholesterol Dependence of Semliki Forest Virus Fusion. **Journal of Virology**, v. 74, n. 4, p. 1623–1631, 15 fev. 2000.

CHERMETTE, H. Density functional theory. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 178–180, p. 699–721, dez. 1998.

CHING, K.-C.; F. P. NG, L.; CHAI, C. L. L. A compendium of small molecule direct-acting and host-targeting inhibitors as therapies against alphaviruses. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 72, n. 11, p. 2973–2989, 1 nov. 2017.

CHUNG, L. W. et al. The ONIOM Method and Its Applications. **Chemical Reviews**, v. 115, n. 12, p. 5678–5796, 24 jun. 2015.

COHEN, S. N. et al. Dengue and Chikungunya Virus Infection in Man in Thailand, 1962–

1964. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 18, n. 6, p. 954–971, 1 nov. 1969.

CORTES-CLERGET, M. et al. Water as the reaction medium in organic chemistry: from our worst enemy to our best friend. **Chemical Science**, v. 12, n. 12, p. 4237–4266, 2021.

CREIGHTON, D. J.; GESSOUROUN, M. S.; HEAPES, J. M. Is the thiolate—imidazolium ion pair the catalytically important form of papain? **FEBS Letters**, v. 110, n. 2, p. 319–322, 11 fev. 1980.

DA COSTA, C. H. S. et al. Evaluating QM/MM Free Energy Surfaces for Ranking Cysteine Protease Covalent Inhibitors. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 60, n. 2, p. 880–889, 24 fev. 2020.

DA SILVA-JÚNIOR, E. F. et al. The medicinal chemistry of Chikungunya virus. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 25, n. 16, p. 4219–4244, ago. 2017.

DA SILVA-JÚNIOR, E. F.; ZHAN, P. Recent advances in medicinal chemistry of Neglected Tropical Diseases (NTDs). **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 259, p. 115714, nov. 2023.

DE CALUWÉ, L.; ARIËN, K. K.; BARTHOLOMEEUSEN, K. Host Factors and Pathways Involved in the Entry of Mosquito-Borne Alphaviruses. **Trends in Microbiology**, v. 29, n. 7, p. 634–647, jul. 2021.

DE LA ROQUE, D. G. L. et al. Exploring the Chikungunya virus landscape in a dengue-endemic Brazilian area. **Journal of Infection and Public Health**, v. 17, n. 7, p. 102442, jul. 2024.

DEEBA, F. et al. Potential entry inhibitors of the envelope protein (E2) of Chikungunya virus: in silico structural modeling, docking and molecular dynamic studies. **VirusDisease**, v. 28, n. 1, p. 39–49, 9 mar. 2017.

DING, M.; SCHLESINGER, M. J. Evidence that sindbis virus NSP2 is an autoprotease which processes the virus nonstructural polyprotein. **Virology**, v. 171, n. 1, p. 280–284, jul. 1989.

DRENTH, J.; KALK, K. H.; SWEN, H. M. Binding of chloromethyl ketone substrate analogs to crystalline papain. **Biochemistry**, v. 15, n. 17, p. 3731–3738, 24 ago. 1976.

ELEFThERIADOU, I. et al. Selective transduction of astrocytic and neuronal CNS subpopulations by lentiviral vectors pseudotyped with Chikungunya virus envelope. **Biomaterials**, v. 123, p. 1–14, abr. 2017.

FAISAL, S. et al. Computational Study of SARS-CoV-2 RNA Dependent RNA Polymerase Allosteric Site Inhibition. **Molecules**, v. 27, n. 1, p. 223, 30 dez. 2021.

FARIAS, V. A. DE et al. Enzymatic hydrolysis of wheat gluten employing cysteine proteases from noni fruits (*Morinda citrifolia* L.). **Journal of Cereal Science**, v. 117, p. 103929, maio 2024.

FARRELL, D. F. et al. Case Report: An Acute Chikungunya Infection and a Recent Secondary Dengue Infection in a Peripartum Case in Ecuador. **The American Journal of**

Tropical Medicine and Hygiene, v. 98, n. 3, p. 838–840, 7 mar. 2018.

FUKUI, K. The path of chemical reactions - the IRC approach. **Accounts of Chemical Research**, v. 14, n. 12, p. 363–368, 1 dez. 1981.

G.W.T. M. J. FRISCH H. B. SCHLEGEL G. E. SCUSERIA, J. R. C. M. A. R. G. S. et al. Gaussian 09, Revision D.01 , Gaussian, Inc.,. **Gaussian, Inc., Wallingford CT**, 2013.

GEORGIEVA, P.; HIMO, F. Quantum chemical modeling of enzymatic reactions: The case of histone lysine methyltransferase. **Journal of Computational Chemistry**, v. 31, n. 8, p. 1707–1714, 15 jun. 2010.

GOBBI, F. et al. Emergence and Surveillance of Chikungunya. **Current Tropical Medicine Reports**, v. 2, n. 1, p. 4–12, 28 mar. 2015.

GOLUBTSOV, A.; KÄÄRIÄINEN, L.; CALDENTY, J. Characterization of the cysteine protease domain of Semliki Forest virus replicase protein nsP2 by in vitro mutagenesis. **FEBS Letters**, v. 580, n. 5, p. 1502–1508, 20 fev. 2006.

GOULD, E. A. et al. Understanding the alphaviruses: Recent research on important emerging pathogens and progress towards their control. **Antiviral Research**, v. 87, n. 2, p. 111–124, ago. 2010.

GRAZIOSO, G. et al. Mechanism of falcipain-2 inhibition by α,β -unsaturated benzo[1,4]diazepin-2-one methyl ester. **Journal of Computer-Aided Molecular Design**, v. 26, n. 9, p. 1035–1043, 11 set. 2012.

HIMO, F. Recent Trends in Quantum Chemical Modeling of Enzymatic Reactions. **Journal of the American Chemical Society**, v. 139, n. 20, p. 6780–6786, 24 maio 2017.

HOHENBERG, P.; KOHN, W. Inhomogeneous Electron Gas. **Physical Review**, v. 136, n. 3B, p. B864–B871, 9 nov. 1964.

HOWARD, A. E.; KOLLMAN, P. A. OH- versus SH- nucleophilic attack on amides: dramatically different gas-phase and solvation energetics. **Journal of the American Chemical Society**, v. 110, n. 21, p. 7195–7200, 1 out. 1988.

JAIN, J. et al. In silico analysis of natural compounds targeting structural and nonstructural proteins of chikungunya virus. **F1000Research**, v. 6, p. 1601, 8 dez. 2017.

KÄSTNER, J. et al. QM/MM Free-Energy Perturbation Compared to Thermodynamic Integration and Umbrella Sampling: Application to an Enzymatic Reaction. **Journal of Chemical Theory and Computation**, v. 2, n. 2, p. 452–461, 1 mar. 2006.

KAUKONEN, M. et al. Lennard-Jones parameters for small diameter carbon nanotubes and water for molecular mechanics simulations from van der Waals density functional calculations. **Journal of Computational Chemistry**, v. 33, n. 6, p. 652–658, 5 mar. 2012.

KEILLOR, J. W.; BROWN, R. S. Attack of zwitterionic ammonium thiolates on a distorted anilide as a model for the acylation of papain by amides. A simple demonstration of a bell-shaped pH/rate profile. **Journal of the American Chemical Society**, v. 114, n. 21, p. 7983–7989, 1 out. 1992.

KHAN, A. H. et al. Complete nucleotide sequence of chikungunya virus and evidence for

an internal polyadenylation site. **Journal of General Virology**, v. 83, n. 12, p. 3075–3084, 1 dez. 2002.

KIELIAN, M.; REY, F. A. Virus membrane-fusion proteins: more than one way to make a hairpin. **Nature Reviews Microbiology**, v. 4, n. 1, p. 67–76, 1 jan. 2006.

KOHN, W.; SHAM, L. J. Self-Consistent Equations Including Exchange and Correlation Effects. **Physical Review**, v. 140, n. 4A, p. A1133–A1138, 15 nov. 1965.

KOLONIN, M. G. et al. Reversal of obesity by targeted ablation of adipose tissue. **Nature Medicine**, v. 10, n. 6, p. 625–632, 9 jun. 2004.

KUMAR, D. et al. Selective Docking of Pyranooxazoles Against nsP2 of CHIKV Eluted Through Isothermally and Non-Isothermally MD simulations. **ChemistrySelect**, v. 5, n. 14, p. 4210–4220, 16 abr. 2020.

KUMAR, R. et al. Chikungunya and arthritis: An overview. **Travel Medicine and Infectious Disease**, v. 44, p. 102168, nov. 2021.

KUZMANIC, A. et al. Investigating Cryptic Binding Sites by Molecular Dynamics Simulations. **Accounts of Chemical Research**, v. 53, n. 3, p. 654–661, 17 mar. 2020.

LEE, C.; YANG, W.; PARR, R. G. Development of the Colle-Salvetti correlation-energy formula into a functional of the electron density. **Physical Review B**, v. 37, n. 2, p. 785–789, 15 jan. 1988.

LEUNG, J. Y.-S.; NG, M. M.-L.; CHU, J. J. H. Replication of Alphaviruses: A Review on the Entry Process of Alphaviruses into Cells. **Advances in Virology**, v. 2011, p. 1–9, 2011.

LEWIS, S. D.; JOHNSON, F. A.; SHAFER, J. A. Effect of cysteine-25 on the ionization of histidine-159 in papain as determined by proton nuclear magnetic resonance spectroscopy. Evidence for a histidine-159-cysteine-25 ion pair and its possible role in catalysis. **Biochemistry**, v. 20, n. 1, p. 48–51, 6 jan. 1981.

LEWIS, S. D.; SHAFER, J. A. Ionization of a nitrophenol-containing reporter group at the active site of papain. **Biochemistry**, v. 13, n. 4, p. 690–698, 1 fev. 1974.

LIAO, R.-Z.; SIEGBAHN, P. E. M. Energetics for the Mechanism of Nickel-Containing Carbon Monoxide Dehydrogenase. **Inorganic Chemistry**, v. 58, n. 12, p. 7931–7938, 17 jun. 2019.

LIAO, R.-Z.; YU, J.-G.; HIMO, F. Quantum Chemical Modeling of Enzymatic Reactions: The Case of Decarboxylation. **Journal of Chemical Theory and Computation**, v. 7, n. 5, p. 1494–1501, 10 maio 2011.

LIAO, R.; SIEGBAHN, P. E. M. Quantum Chemical Modeling of Homogeneous Water Oxidation Catalysis. **ChemSusChem**, v. 10, n. 22, p. 4236–4263, 23 nov. 2017.

LILIH SITI SOLIHAT, KAZUTOMO KAWAGUCHI, AND H. N. All-Atom Molecular Dynamics Simulations and Infrared Spectral Analysis of Myosin. **Sci. Rep. Kanazawa Univ.**, v. 67, p. 41–56, 2024.

LIU, Q. et al. Virus assembly. In: **Molecular Medical Microbiology**. [s.l.] Elsevier, 2024.

p. 2131–2175.

LONSDALE, R.; HARVEY, J. N.; MULHOLLAND, A. J. A practical guide to modelling enzyme-catalysed reactions. **Chemical Society Reviews**, v. 41, n. 8, p. 3025, 2012.

MARSH, M.; HELENIUS, A. Virus Entry: Open Sesame. **Cell**, v. 124, n. 4, p. 729–740, fev. 2006.

MATIĆ, J. et al. Calanus finmarchicus as a novel source of health-promoting bioactive peptides: Enzymatic protein hydrolysis, characterization, and in vitro bioactivity. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 52, p. 102820, set. 2023.

MEMON, M. et al. IN-SILICO DOCKING AND MOLECULAR DYNAMIC SIMULATION STUDIES OF NSP2 PROTEASE FROM CHIKUNGUNYA VIRUS. **Journal of Bio Innovation**, v. 10, n. 4, p. 1009–1025, 15 ago. 2021.

MENDES, A.; KUHN, R. Alphavirus Nucleocapsid Packaging and Assembly. **Viruses**, v. 10, n. 3, p. 138, 20 mar. 2018.

MORRISON, T. E.; ANDER, S. E. Chikungunya Virus (Togaviridae). In: **Encyclopedia of Virology**. [s.l.] Elsevier, 2021. p. 173–181.

NARWAL, M. et al. Crystal structure of chikungunya virus nsP2 cysteine protease reveals a putative flexible loop blocking its active site. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 116, p. 451–462, set. 2018.

NEILL, J. D. Nucleotide sequence of a region of the feline calicivirus genome which encodes picornavirus-like RNA-dependent RNA polymerase, cysteine protease and 2C polypeptides. **Virus Research**, v. 17, n. 3, p. 145–160, nov. 1990.

OANCA, G. et al. Exploring the Catalytic Reaction of Cysteine Proteases. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 124, n. 50, p. 11349–11356, 17 dez. 2020.

OĞUZ, I. C.; VASSETTI, D.; LABAT, F. Assessing the performances of different continuum solvation models for the calculation of hydration energies of molecules, polymers and surfaces: a comparison between the SMD, VASPsol and FDPB models. **Theoretical Chemistry Accounts**, v. 140, n. 8, p. 99, 3 ago. 2021.

PADHI, A. K.; JANEŽIČ, M.; ZHANG, K. Y. J. Molecular dynamics simulations: Principles, methods, and applications in protein conformational dynamics. In: **Advances in Protein Molecular and Structural Biology Methods**. [s.l.] Elsevier, 2022. p. 439–454.

PASTORINO, B. A. M. et al. Expression and biochemical characterization of nsP2 cysteine protease of Chikungunya virus. **Virus Research**, v. 131, n. 2, p. 293–298, fev. 2008.

PERERA, R. et al. Alphavirus Nucleocapsid Protein Contains a Putative Coiled Coil α -Helix Important for Core Assembly. **Journal of Virology**, v. 75, n. 1, p. 1–10, jan. 2001.

RAMPHAL, Y. et al. Understanding the Transmission Dynamics of the Chikungunya Virus in Africa. **Pathogens**, v. 13, n. 7, p. 605, 22 jul. 2024.

RASHAD, A. A.; KELLER, P. A. Structure based design towards the identification of novel binding sites and inhibitors for the chikungunya virus envelope proteins. **Journal of**

Molecular Graphics and Modelling, v. 44, p. 241–252, jul. 2013.

RASHAD, A. A.; MAHALINGAM, S.; KELLER, P. A. Chikungunya Virus: Emerging Targets and New Opportunities for Medicinal Chemistry. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 57, n. 4, p. 1147–1166, 27 fev. 2014.

RIBEIRO, A. J. M. et al. Enzymatic Flexibility and Reaction Rate: A QM/MM Study of HIV-1 Protease. **ACS Catalysis**, v. 5, n. 9, p. 5617–5626, 4 set. 2015.

RINIKER, S. Fixed-Charge Atomistic Force Fields for Molecular Dynamics Simulations in the Condensed Phase: An Overview. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 58, n. 3, p. 565–578, 26 mar. 2018.

S. RUSSELL LEHRMAN. **Protein Structure**. [s.l.: s.n.].

SAGAR, R. et al. Viremia and clinical manifestations in acute febrile patients of Chikungunya infection during the 2016 CHIKV outbreak in Delhi, India. **Infectious Medicine**, v. 3, n. 1, p. 100088, mar. 2024.

SAISAWANG, C. et al. Chikungunya nsP2 protease is not a papain-like cysteine protease and the catalytic dyad cysteine is interchangeable with a proximal serine. **Scientific Reports**, v. 5, n. 1, p. 17125, 24 nov. 2015.

SAISAWANG, C. et al. Glutathionylation of chikungunya nsP2 protein affects protease activity. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, v. 1861, n. 2, p. 106–111, fev. 2017.

SAJID, M.; MCKERROW, J. H. Cysteine proteases of parasitic organisms☆. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 120, n. 1, p. 1–21, mar. 2002.

SANTOS-JÚNIOR, P. F. DA S. et al. A consensus reverse docking approach for identification of a competitive inhibitor of acetyltransferase enhanced intracellular survival protein from Mycobacterium tuberculosis. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 108, p. 117774, jun. 2024.

SCOTT, L. et al. Neglected Tropical Diseases & Atrial Fibrillation. In: **Neglected Tropical Diseases and other Infectious Diseases affecting the Heart**. [s.l.] Elsevier, 2022. p. 213–228.

SHENG, X.; HIMO, F. The Quantum Chemical Cluster Approach in Biocatalysis. **Accounts of Chemical Research**, v. 56, n. 8, p. 938–947, 18 abr. 2023.

SHIRAKO, Y.; STRAUSS, J. H. Regulation of Sindbis virus RNA replication: uncleaved P123 and nsP4 function in minus-strand RNA synthesis, whereas cleaved products from P123 are required for efficient plus-strand RNA synthesis. **Journal of Virology**, v. 68, n. 3, p. 1874–1885, mar. 1994.

SHOLL, D. S. J. A. S. **Density Functional Theory**. [s.l.: s.n.].

SIEGBAHN, P. E. M.; HIMO, F. Recent developments of the quantum chemical cluster approach for modeling enzyme reactions. **JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry**, v. 14, n. 5, p. 643–651, 13 jun. 2009.

SIEGBAHN, P. E. M.; HIMO, F. The quantum chemical cluster approach for modeling enzyme reactions. **WIREs Computational Molecular Science**, v. 1, n. 3, p. 323–336, 10 maio 2011.

SILVA-JUNIOR, E. F. et al. Dynamic Simulation, Docking and DFT Studies Applied to a Set of Anti-Acetylcholinesterase Inhibitors in the enzyme β -Secretase (BACE-1): An Important Therapeutic Target in Alzheimer's Disease. **Current Computer-Aided Drug Design**, v. 13, n. 4, 10 nov. 2017.

SILVA, M. M. et al. Interaction between bioactive compound 11a-N-tosyl-5-deoxy-pterocarpan (LQB-223) and Calf thymus DNA: Spectroscopic approach, electrophoresis and theoretical studies. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 96, p. 223–233, mar. 2017.

SINGH, S. K.; UNNI, S. K. Chikungunya virus: host pathogen interaction. **Reviews in Medical Virology**, v. 21, n. 2, p. 78–88, 15 mar. 2011.

SIRIRAK, J. et al. Benchmarking quantum mechanical methods for calculating reaction energies of reactions catalyzed by enzymes. **PeerJ Physical Chemistry**, v. 2, p. e8, 20 maio 2020.

SMITH, N.; WILSON, M. A. Understanding Cysteine Chemistry Using Conventional and Serial X-ray Protein Crystallography. **Crystals**, v. 12, n. 11, p. 1671, 19 nov. 2022.

SOLIGNAT, M. et al. Replication cycle of chikungunya: A re-emerging arbovirus. **Virology**, v. 393, n. 2, p. 183–197, out. 2009.

SOURISSEAU, M. et al. Characterization of Reemerging Chikungunya Virus. **PLoS Pathogens**, v. 3, n. 6, p. e89, 29 jun. 2007.

SOUZA, B. G. DE et al. Design, synthesis, antiviral evaluation, and In silico studies of acrylamides targeting nsP2 from Chikungunya virus. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 258, p. 115572, out. 2023.

STAROVEROV, V. N. et al. Comparative assessment of a new nonempirical density functional: Molecules and hydrogen-bonded complexes. **The Journal of Chemical Physics**, v. 119, n. 23, p. 12129–12137, 15 dez. 2003.

SUDEEP, A. B.; PARASHAR, D. Chikungunya: an overview. **Journal of Biosciences**, v. 33, n. 4, p. 443–449, 1 nov. 2008.

SUPPAN, P. Invited review solvatochromic shifts: The influence of the medium on the energy of electronic states. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, v. 50, n. 3, p. 293–330, jan. 1990.

TANG, B. L. The cell biology of Chikungunya virus infection. **Cellular Microbiology**, v. 14, n. 9, p. 1354–1363, set. 2012.

TAO, J. et al. Climbing the Density Functional Ladder: Nonempirical Meta-Generalized Gradient Approximation Designed for Molecules and Solids. **Physical Review Letters**, v. 91, n. 14, p. 146401, 30 set. 2003.

TOMAR, S.; AGGARWAL, M. Structure and Function of Alphavirus Proteases. In: **Viral**

Proteases and Their Inhibitors. [s.l.] Elsevier, 2017. p. 105–135.

TOMASI, J.; MENNUCCI, B.; CAMMI, R. Quantum Mechanical Continuum Solvation Models. **Chemical Reviews**, v. 105, n. 8, p. 2999–3094, 1 ago. 2005.

V. BARONE, M. C. Quantum Calculation of Molecular Energies and Energy Gradients in Solution by a Conductor Solvent Model. **J. Phys. Chem. A**, 1998.

VAN DER KAMP, M. W. et al. Biomolecular simulation and modelling: status, progress and prospects. **Journal of The Royal Society Interface**, v. 5, n. suppl_3, p. 173–190, 6 dez. 2008.

VAN DUIJL-RICHTER, M. et al. Early Events in Chikungunya Virus Infection—From Virus Cell Binding to Membrane Fusion. **Viruses**, v. 7, n. 7, p. 3647–3674, 7 jul. 2015.

VORA, J. et al. Structure based virtual screening, 3D-QSAR, molecular dynamics and ADMET studies for selection of natural inhibitors against structural and non-structural targets of Chikungunya. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics**, v. 37, n. 12, p. 3150–3161, 13 ago. 2019.

WAPPETT, D. A.; GOERIGK, L. A guide to benchmarking enzymatically catalysed reactions: the importance of accurate reference energies and the chemical environment. **Theoretical Chemistry Accounts**, v. 140, n. 6, p. 68, 24 jun. 2021.

WEI, D. et al. Reaction Pathway and Free Energy Profile for Papain-Catalyzed Hydrolysis of N -Acetyl-Phe-Gly 4-Nitroanilide. **Biochemistry**, v. 52, n. 30, p. 5145–5154, 30 jul. 2013.

WEIGEND, F. Accurate Coulomb-fitting basis sets for H to Rn. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 8, n. 9, p. 1057, 2006.

WEIGEND, F.; AHLRICHS, R. Balanced basis sets of split valence, triple zeta valence and quadruple zeta valence quality for H to Rn: Design and assessment of accuracy. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 7, n. 18, p. 3297, 2005.

WINTACHAI, P. et al. Identification of prohibitin as a Chikungunya virus receptor protein. **Journal of Medical Virology**, v. 84, n. 11, p. 1757–1770, 19 nov. 2012.

YAGI, K.; ITO, S.; SUGITA, Y. Exploring the Minimum-Energy Pathways and Free-Energy Profiles of Enzymatic Reactions with QM/MM Calculations. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 125, n. 18, p. 4701–4713, 13 maio 2021.

YAO, H. et al. Purification, characterisation and visualisation of soybean protein hydrolysis by aspergillopepsin I from mangrove *Aspergillus tubingensis*. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 191, p. 105798, jun. 2024.

ZAID, A. et al. Arthritogenic alphaviruses: epidemiological and clinical perspective on emerging arboviruses. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 21, n. 5, p. e123–e133, maio 2021.

ZHAO, Y.; TRUHLAR, D. G. The M06 suite of density functionals for main group thermochemistry, thermochemical kinetics, noncovalent interactions, excited states, and transition elements: two new functionals and systematic testing of four M06-class functionals and 12 other function. **Theoretical Chemistry Accounts**, v. 120, n. 1–3, p.

215–241, 12 maio 2008.

ZOA-ASSOUMOU, S. et al. Chikungunya Virus: A Brief Review of the Thematic. In: **Emerging and Reemerging Viral Pathogens**. [s.l.] Elsevier, 2020. p. 241–252.

9 ANEXO A – Artigos Publicados e/ou Aceitos

12/01/2025, 17:13 Development of α -acyloxycarboxamides targeting *Leishmania amazonensis* parasite - New Journal of Chemistry (RSC Publis...

Log in / register

Issue 43, 2024 Previous Next

From the journal:
New Journal of Chemistry

Development of α -acyloxycarboxamides targeting *Leishmania amazonensis* parasite†

 Check for updates

[Saraliny B. França](#),^a [Jamilly E. da Silva](#),^a [Leandro R. Silva](#),^a [Emanuelly K. A. Padilha](#),^a [Fernando Almeida-Souza](#),^{id bc} [Lucas S. Barbosa](#),^b [Katia S. Calabrese](#),^b [Dimas J. P. Lima](#)^{*a} and [Edeildo F. da Silva-Júnior](#)^{id *a}

 Author affiliations

Abstract

Leishmaniasis comprise a set of neglected diseases, afflicting over one million people worldwide and frequently leading to fatal outcomes, mainly in their visceral form. The current treatment often comes with severe side effects and limitations regarding its effectiveness. It is imperative to explore novel therapeutic avenues that are more potent and less toxic. In this study, we successfully synthesized α -acyloxycarboxamides (also known as depsipeptides). These compounds underwent rigorous evaluation through a combination of molecular docking, molecular dynamics (MD) simulations, and *in vitro* assessments against both promastigote and amastigote forms of *Leishmania amazonensis*. Notably, most of the α -acyloxycarboxamides showed substantially low cytotoxicity in peritoneal macrophages with a CC_{50} above 400 μ M, whereas amphotericin B (positive control) showed a CC_{50} value greater than 50 μ M. This effect is reflected in the selectivity index (SI), where compounds **7a₁** and **7db₁** showed more favorable results (SI >14.66 and 10.44) when compared to the positive control (SI > 10.36). *In vitro* experiments demonstrated that the α -acyloxycarboxamides effectively inhibited the growth of axenic promastigote forms of *L. amazonensis*. Particularly, compounds **7a₁** (IC_{50} = 31.83 μ M) and **7db₁** (IC_{50} = 33.88 μ M) stood out, displaying significant activity in reducing intracellular parasites as well (IC_{50} = 27.28 and 38.31 μ M, respectively). To gain insights into the potential pathway of activity for

<https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2024/nj/d4nj02541e> 1/6



Search here...

[Login](#)[Register](#)[Cart](#) 0

Current Drug Targets

Editor-in-Chief

ISSN (Print): 1389-4501

ISSN (Online): 1873-5592

[Back](#)[Journal](#)[Subscribe](#)[Translate in Chinese](#)[Review Article](#)

Multi-target Compounds against Trypanosomatid Parasites and *Mycobacterium tuberculosis*

Author(s): Midiane Correia Gomes¹, Emanuely Karla Araújo Padilha¹, Gustavo Rafael Angelo Diniz, Edilma Correia Gomes, Paulo Fernando da Silva Santos-Júnior, Peng Zhan and Edeildo Ferreira da Silva-Júnior*

Volume 25, Issue 9, 2024

Published on: 15 June, 2024

Page: [602 - 619]

Pages: 18

DOI: [10.2174/0113894501306843240606114854](https://doi.org/10.2174/0113894501306843240606114854)

Price: \$65





THE INTERNATIONAL
MEDICINE AND BIOSCIENCES
CONFERENCE 2025
09- 08 November, 2025, Dubai, UAE

22nd in the series of Eureka Science
Translational Medicine Conferences

**Call for Papers and
Presentations**
[Submit Now](#)

Early Bird Discount
Register by: January 31, 2025



Abstract

Multi-target drug treatment has become popular as a substitute for traditional monotherapy. Monotherapy can lead to resistance and side effects. Multi-target drug discovery is gaining importance as data on bioactivity becomes more abundant. The design of multi-target drugs is expected to be an important development in the pharmaceutical industry in the near future. This review presents multi-target compounds against trypanosomatid parasites (*Trypanosoma cruzi*, *T. brucei*, and *Leishmania* sp.) and tuberculosis (*Mycobacterium tuberculosis*), which mainly affect populations in socioeconomically unfavorable conditions. The article analyzes the studies, including their chemical structures, viral strains, and molecular docking studies, when available. The objective of this review is to establish a foundation for designing new multi-target inhibitors for these diseases.

Keywords: [Multi-target compounds](#), [trypanosoma](#), [leishmaniasis](#), [tuberculosis](#), [neglected tropical diseases](#), [monotherapy](#).

[« Previous](#)[Next »](#)

Graphical Abstract



Research paper

Nanomolar activity of coumarin-3-thiosemicarbazones targeting *Trypanosoma cruzi* cruzain and the *T. brucei* cathepsin L-like protease

Jéssica Alves Nunes ^{a,1}, Paulo Fernando da Silva Santos-Júnior ^{b,1}, Midiane Correa Gomes ^{a,1}, Luiz Alberto Santos Ferreira ^{c,1}, Emanuely Karla Araújo Padilha ^a, Thaiz Rodrigues Teixeira ^d, Emily J. Stanger ^d, Yashpreet Kaur ^d, Elany Barbosa da Silva ^d, Clara Andrezza Crisóstomo Bezerra Costa ^e, Johnnatan Duarte de Freitas ^e, João Xavier de Araújo-Júnior ^b, Francisco Jaime Bezerra Mendonça-Junior ^f, Miriam A. Giardini ^d, Jair L. Siqueira-Neto ^d, Conor R. Caffrey ^d, Peng Zhan ^g, Sílvia Helena Cardoso ^c  , Edeildo Ferreira da Silva-Júnior ^a  

[Show more](#)  Share  Cite<https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2024.117109> [Get rights and content](#) 

Abstract

Trypanosoma cruzi (*T. cruzi*) and *Trypanosoma brucei* (*T. brucei*) urgently demand innovative drug development due to their impact on public health worldwide. Their cysteine proteases, Cruzain (CRZ) and the *T. brucei* Cathepsin L-like protease (*Tbr*CATL) are established drug targets for these parasites. In this study, our coumarin-3-thiosemicarbazones demonstrated nanomolar IC₅₀ values (22–698 nM) toward these proteases. Against *T. cruzi* amastigotes and *T. brucei* trypomastigotes, **LASF-01** displayed a promising result. Herein, **MCG-02**, the most potent *Tbr*CATL inhibitor, underwent comprehensive analyses, including cytotoxicity assessments and *in vitro* tests. Molecular dynamics (MD) simulations and a multiscale Quantum Mechanics/Quantum Mechanics



Emanuely Padilha <emanuely.padilha@arapiraca.ufal.br>

Fwd: Preliminary Acceptance | BMS-CTMC-2024-HT242-5771-6

3 mensagens

Edeildo Junior <edeildo.junior@iqb.ufal.br>

9 de dezembro de 2024 às 09:57

Para: Emanuely Padilha <emanuely.padilha@arapiraca.ufal.br>, Arestides Lins <arestides.lins@ctec.ufal.br>, Wadja Silva <wadja.silva@iqb.ufal.br>

Bom dia, mais uma boa notícia para nós.

Abraço. Parabéns para vocês.

----- Forwarded message -----

De: **Current Topics in Medicinal Chemistry** <admin@bentham.manuscriptpoint.com>

Date: seg., 9 de dez. de 2024 às 03:35

Subject: Preliminary Acceptance | BMS-CTMC-2024-HT242-5771-6

To: <edeildo.junior@iqb.ufal.br>

Cc: <ambreenirshad@benthamsience.net>, <igor.nascimento@cesmac.edu.br>

Reference#: BMS-CTMC-2024-HT242-5771-6**Submission Title:** Application of Artificial Intelligence-Based Approaches in the Discovery and Development of Protein Kinase Inhibitors (PKI) Targeting Anticancer Activity

Dear Dr. Edeildo Ferreira da Silva-Júnior,

On behalf of Bentham Science, I am pleased to inform you that your article titled "**Application of Artificial Intelligence-Based Approaches in the Discovery and Development of Protein Kinase Inhibitors (PKI) Targeting Anticancer Activity**", with Reference No. "BMS-CTMC-2024-HT242-5771-6" has been found generally acceptable for publication, following an independent peer review.

Certain aspects of your submission relating to the quality of language, plagiarism/ similarity, figures and use of AI tools (if any) may require additional scrutiny by our Quality Assurance Department before final acceptance and publication.

Attached is your digitally signed copyright letter for your records.

We appreciate your valuable contribution to "**Current Topics in Medicinal Chemistry**" and look forward to successful collaboration in the future.

With warm regards,

Editorial Office
Current Topics in Medicinal Chemistry
Bentham Science Publishers

For complaints contact: complaint@benthamsience.netContribute to our [Newsletter](#): Send us updates about your research to newsletter@benthamsience.net.[Sign up](#) to receive updates from Bentham Science.**Attachments:**[Copyright Letter \(CTMC\).docx copyright_form.pdf](#)To unsubscribe from MPS and stop receiving emails further. **Please Click [Here](#)**